Membraneigenschaften nichtspikender L-Neurone im Ocellusnerv von Locusta migratoria L

Josef Ammermüller

Diss
München
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534901_0010

Membraneigenschaften nichtspikender L-Neurone im Ocellusnerv von Locusta migratoria L.

Inaugural - Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie der Ludwig - Maximilians - Universität München

vorgelegt von Josef Ammermüller aus Rotthalmünster

München 1984

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Zettler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Schuller

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 12. 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut der Universität München in der Arbeitsgruppe Prof. F.Zettler angefertigt.

Herzlich danken möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Zettler und Weiler, insbesondere Irene für die EM-Arbeiten. Für die Schaltpläne der Voltage-Clamp Apparatur bin ich Herrn Jens Meyer zu großem Dank verpflichtet. Herr M.Galvan gab mir einige wichtige Tips. Ohne die ausgezeichnete Arbeit der Institutswerkstatt wären diese Untersuchungen wahrscheinlich kaum durchführbar gewesen.
Das Projekt wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	Seite 1
2.	MATERIAL UND METHODEN	
2.1	Versuchstiere und Präparation	11
2.2	Verwendete Lösungen und Lösungswechsel	15
2.3	Elektrophysiologische Methoden	17
2.3.1	Current-Clamp und Voltage-Clamp Verstärker	17
2.3.2	Elektroden, Verstärkungsfaktor und Schwingneigung	19
2.3.3	Serienwiderstandskompensation	22
2.3.4	Kontrolle von Doppelableitungen	23
2.4	Registrierung und Auswertung	25
2.5	Histologie	27
3.	ERGEBNISSE	
3.1	Lichtinduzierte Potentialänderungen	3o
3.2	Current-Clamp Experimente	35
3.2.1	Current-Clamp mit einer Elektrode und Bridge-Balance	35
3.2.2	Current-Clamp mit zwei Elektroden	37
3.2.3	Schnelle Potentialänderungen im Current-Clamp	39
3.2.4	Strom-Spannungs Kennlinie bei verschieden langen Stromimpulsen	41
3.2.5	Passive Membraneigenschaften	45
3.3	Voltage-Clamp Experimente	53
3.3.1	Ströme in Normalringer	55
3.3.2	Charakterisierung des schnellen Einwärtsstromes	62
3.3.3	Charakterisierung des schnellen Auswärtsstromes	68
3.3.4	Langsame Ströme	76
3.3.4.1	Beeinflußung der langsamen Ströme durch Curare und $CoCl_2$	8o

3.3.4.2 Beeinflußung der langsamen Ströme durch 4-Aminopyridin 85
3.3.5 Einflüße der verschiedenen Pharmaka auf die lichtinduzierten Potentialänderungen der L-Neurone 88
3.3.5.1 Tetrodotoxin 88
3.3.5.2 4-Aminopyridin 90

4. DISKUSSION

4.1 Die Eignung der L-Neurone für membranphysiologische Fragestellungen 94
4.2 Die passiven Membraneigenschaften der L-Neurone 97
4.3 "Aktionspotentiale" in nichtspikenden Neuronen? 99
4.4 Das Ruhepotential der L-Neurone 100
4.5 Die schnellen Ströme im Voltage-Clamp 105
4.6 Die anormale Gleichrichtung 108
4.7 Langsame Ströme in depolarisierender Richtung 111
4.8 Die Lichtantwort der L-Neurone 113

5. ZUSAMMENFASSUNG 119

6. LITERATUR 123

1. EINLEITUNG

Viele Insektenarten besitzen neben den Komplexaugen weitere Lichtsinnesorgane in Form von Ocellen. Diese, meist drei an der Zahl, sind durch Nerven, in denen die Axone der Sekundärneurone verlaufen, mit dem Oberschlundganglion verbunden.

Die Struktur der Zellen, die an der ocellären Verschaltung beteiligt sind, konnte durch eine Reihe anatomischer Arbeiten bereits weitgehend aufgeklärt werden (Chappell et al. 1978, C.S.Goodman 1974, 1976a, 1976b, C.S.Goodman & Williams 1976, L.J.Goodman 197o, L.J.Goodman et al. 1975, 1976, 1979, Guy et al. 1977, 1979, Mizunami et al. 1982, Patterson & Chappell 198o, Toh & Sagara 1984, Toh & Hara 1984). Dabei erregten insbesondere die großen, sogenannten L-Neurone Interesse. Bei diesen handelt es sich um pseudounipolare Nervenzellen, deren Somata im Oberschlundganglion liegen. Aus jedem Soma entspringt ein einzelner Neurit, der sich T- oder Y-förmig aufspaltet und einen langen Axon bildet. Die Grundstruktur dieser Zellen entspricht also der eines typischen Insektenneurons. Ein Charakteristikum der L-Neurone ist ihre zahlenmäßige Konstanz in jeder Spezies und das für jedes Neuron typische Projektionsgebiet. Damit läßt sich jede Zelle einzeln benennen und identifizieren (C.S.Goodman 1974, 1976b, Koontz & Edwards 1984).

Die Axone der L-Neurone verbinden durch die Ocellusnerven, je nach Typ, entweder die Ocellen untereinander

oder jeweils einen Ocellus mit dem Oberschlundganglion. Den medianen Ocellusnerv der Heuschrecken zum Beispiel durchziehen sieben Axone mit 1o-3o µm Durchmesser. Von diesen projizieren drei ($M1_L$, $M1_R$, M2) in das Oberschlundganglion und jeweils zwei ($ML1\text{-}2_L$, $ML1\text{-}2_R$) in die beiden lateralen Ocellen (C.S.Goodman 1976b). Sie erstrecken sich dabei über eine Distanz von circa 1-3 mm. Neben diesen dicken Axonen der L-Neurone befinden sich im Nerv noch etwa sechzig Axone mit Durchmessern kleiner als 2 µm, die in die verschiedensten Bereiche des Oberschlundganglions ziehen (C.S.Goodman & Williams 1976).

Seit den ersten intrazellulären Ableitungen, die später durch Markierungen mit Farbstoffen ergänzt wurden, ist auch über die Physiologie des Ocellus mehr bekannt (Chappell & Dowling 1972, Guy et al. 1979, Klingman & Chappell 1978, Mobbs et al. 1981, Mizunami et al. 1982, Patterson 1976, Patterson & L.J.Goodman 1974, Taylor 1981, Simmons 1982a, 1982b, Wilson 1978a, 1978b, 1978c, Review von L.J.Goodman 1981).
Ein Lichtblitz erzeugt in den Rezeptorzellen eine depolarisierende Potentialänderung, die der in den Komplexaugen gleicht (Chappell & Dowling 1972,Patterson & Cappell 198o, Patterson & L.J.Goodman 1974, Simmons 1982b). Diese Lichtantwort wird in der plexiformen Schicht des Ocellus auf Sekundärneurone übertragen, von denen es sowohl spikende als auch nichtspikende gibt (Simmons 1982b, Wilson 1978a). Durch Injektionen von Fluoreszenzfarbstoffen

oder von $CoCl_2$ konnte nachgewiesen werden, daß der morphologische Typ der L-Neurone den nichtspikenden Neuronen entspricht (Mobbs et al. 1981, Mizunami et al. 1982, Taylor 1981). Nur bei der Biene scheint es sowohl spikende als auch nichtspikende L-Neurone zu geben (Milde 1981, 1984, Milde & Homberg 1984).

Die nichtspikenden L-Neurone aller bis jetzt untersuchten Arten reagieren auf Lichtreizung ziemlich einheitlich. Beim Einsetzen des Lichtreizes zeigen sie nach einer Latenzzeit von 1o-2o ms eine schnelle hyperpolarisierende Potentialänderung ("on-Spitze"), die in eine Plateauphase übergeht. Bei Lichtende erzeugen sie oft eine oder mehrere, schnelle Depolarisationen ("fast off transients"), und eine anschließende langsame Depolarisation ("slow off transient"), die dann wieder zum Ruhepotential hin abklingt. Die Intensität des Lichtreizes wird dabei durch die Amplitude des graduierten Potentials codiert (Patterson & L.J.Goodman 1974). Untersuchungen der spektralen Empfindlichkeit ergaben maximale Werte im grünen und im ultravioletten Bereich des Spektrums (Mobbs et al. 1981, Chappell & DeVoe 1975, Wilson 1978a). Auffallend für L-Neurone sind außerdem relativ starke und schnelle Potentialschwankungen um das Ruhepotential, die im allgemeinen als "Rauschen" bezeichnet werden. Sie ähneln damit in ihren Antworteigenschaften sehr stark den Monopolaren der Insektenlamina und den Bipolarzellen der Vertebratenretina (Jährvilehto & Zettler 1971, Kaneko 197o, Laughlin 1973, Richter & Simon 1975,

Naka 1977, Shaw 1968, Werblin & Dowling 1969). Dies deutet darauf hin, daß diese Art von Potentialänderung allgemeinere Bedeutung für die Verarbeitung von Lichtreizen besitzt.

Nachdem nichtspikende Neurone in den verschiedensten Präparaten lange Zeit als Artefakte angesehen wurden, gilt es inzwischen als erwiesen, daß graduierte Potentiale nicht nur in Dendriten und Somata der Informationsverarbeitung dienen (Pearson 1976, Roberts & Bush 1981). Neben dem Wirbeltierauge, in dem bis zur Ebene der Amakrinen- und Ganglienzellen alle Neurone durch graduierte Potentiale interagieren (Fain 1981, Kaneko 197o, Naka 1977, Werblin & Dowling 1969), kennt man weitere Beispiele vor allem bei den Krebsen (Streckrezeptoren: Ripley et al. 1968, Blight & Llinas 198o; mechanosensorische Interneurone: Reichert et al. 1983; visuelle Interneurone: Stuart & Oertel 1978) und bei den Insekten (motorische Interneurone: Pearson & Fuortner 1975, Siegler & Burrows 1979; visuelle Interneurone: Shaw 1968, Jährvilehto & Zettler 1971).
Der Nachweis nichtspikender Neurone warf unter anderem die Frage auf, ob diese Zellen als rein passive Elemente zur Übertragung postsynaptischer Potentiale zu betrachten sind, oder ob sie auch aktive Membraneigenschaften besitzen. Als aktiv wird dabei nach Rall (1977, S.41) definiert: "An active membrane exhibits changing impedance, and/or electromotive force, and regenerative coupling to

the transmembrane potential". Aufgrund von Dekrementmessungen und Stromeinprägungsversuchen kamen Zettler & Jährvilehto (1971, 1973) und Zettler & Weiler (1981) zu der Schlußfolgerung, daß aktive Membranmechanismen in den Monopolaren der Fliegenlamina die Ausbreitung der graduierten Potentiale unterstützen. Wegen der indirekten Beweisführung wurde diese Möglichkeit jedoch lange Zeit angezweifelt. Erst in neuerer Zeit wurden spannungsabhängige Leitfähigkeiten bei nichtspikenden Neuronen festgestellt. In den Photorezeptoraxonen der Entenmuscheln wiesen Edgington & Stuart (1979) Kalziumströme nach. Die Streckrezeptoren der Crustaceen sind mit einem Natriumstrom, einem Kalziumstrom, und drei verschiedenen Kaliumströmen mit unterschiedlichem Zeit- und Aktivierungsverhalten ausgestattet (Lowe et al. 1978, Mirolli 1981, 1984). Voltage-Clamp Versuche an Horizontalzellen der Wirbeltierretina ergaben ebenfalls drei Kaliumströme sowie einen Kalziumstrom (Tachibana 1983a, 1983b).

Damit scheinen sich die Membraneigenschaften nichtspikender Neurone denen der Somata vieler Mollusken- und Wirbeltierneurone anzunähern. In diesen existieren eine Reihe von Membranströmen, die die Integration postsynaptischer Potentiale und die Erregbarkeit der Zellen beeinflußen (Adams et al. 1980, Adams 1982, Crill & Schwindt 1983). Im Laufe der Zeit kristallisierte sich dabei heraus, daß verschiedene Typen von Zellen spezifische Leitfähigkeiten in ihren Somata besitzen, die offensichtlich den verschiedenen Funktionen

Voltage-dependent ion channels

Symbol	Name	Function	Found in	Blocked by
Inward currents				
I_{Na}	fast sodium (classical Hodgkin-Huxley)	rapid depolarization (1 msec) propagating nerve impulse initial peak of prolonged impulses	squid axon many neuron cell bodies and axons skeletal muscle	tetrodotoxin (TTX) saxitoxin (STX)
I_{Ca}	calcium	moderately fast depolarization (up to 10 msec) prolonged impulses (shoulders, plateaus)	embryonic cells growth cones many neuron cell bodies and dendrites heart gland cells	cobalt (Co^{2+}) nickel (Ni^{2+}) nifedopine (in heart)
I_B	slow inward (Na^+ and/or Ca^{2+}) "bursting"	slow depolarization (up to secs) generates bursts of impulses depolarizing afterpotentials	molluscan bursting neurons vertebrate bursting neurons (Purkinje, hippocampal?)	
I_{Tl}	transient inward (Ca^{2+} dependent nonspecific cation current)	tonic (background) depolarization "leak currents" in some cells	heart neuroblastoma	
Outward currents				
I_K	delayed rectifier (classical Hodgkin-Huxley) late outward	repolarizes membrane rapidly from Na^+ peak modulates spike shape regulates high-frequency impulse firing	squid axon many neuron cell bodies and axons	tetraethylammonium (TEA) 4-aminopyridine (4-AMP)
I_C $I_{K(Ca)}$	calcium-activated potassium current	turned on by depolarizations role in intracellular Ca^{2+} signaling role in setting membrane potential (controls low-frequency impulse firing	ubiquitous (except squid axon)	barium (Ba^{2+}) TEA
I_{IR}	anomalous rectifier (inward rectifier)	promotes impulses spread in T-tubules keeps K conductance low during plateau potential	skeletal muscle heart muscle egg cells	rubidium (R6)
I_A	fast (transient) outward current early K^+	controls low-frequency impulse firing sensitive to Ca^{2+} in some cells (role in learning?)	molluscan cells	4-aminopyridine (4-AMP) tetraethylammonium (TEA)
I_M	muscarinic	resting K^+ conductance (turned off by acetylcholine, to give depolarization of cell)	vertebrate sympathetic ganglion cell	

Tab.1. Spannungsabhängige Ionenkanäle. Neben diesen neun wichtigsten Arten von Kanälen , die in den verschiedensten Präparaten gefunden wurden, gibt es noch weitere Kanäle. Diese sind allerdings meist noch nicht ausreichend charakterisiert. Die Tabelle stammt aus Shepherd (1983).

angepaßt sind. Deswegen werden inzwischen mindestens neun wichtige Membranströme unterschieden, die in den verschiedensten Neuronen untersucht wurden (Tab.1).

Allgemein ergeben sich dadurch für die Membraneigenschaften nichtspikender Neurone unter anderem zwei Fragen: Erstens, besitzen alle diese Nervenzellen spannungssensitive Leitfähigkeiten, oder sind die bis jetzt bekannten Beispiele Ausnahmen? Zweitens, gibt es typische Membraneigenschaften, die mit der Eigenschaft des "Nichtspikens" verknüpft sind? Um bei der Aufklärung dieser Fragen weiter zu kommen, ist es nötig, entsprechende Präparate zu finden, bei denen die Methode des Voltage-Clamp angewandt werden kann. Unter den bekannten nichtspikenden Neuronen sind die L-Neurone im Ocellusnerv dafür gut geeignet. Bedingt durch die geringe Anzahl der Axone und deren Dicke ist es möglich mit zwei Elektroden in situ aus einer Zelle abzuleiten. Wegen der exponierten Lage des Nervs können außerdem die Zellen pharmakologisch beeinflußt werden, um eventuell vorhandene Ströme näher zu charakterisieren.

Wilson (1978b) führte an den L-Neuronen von Locusta migratoria L. Current-Clamp Versuche durch, bei denen er unter anderem die Strom-Spannungs-Kennlinie aufstellte, und die Leitfähigkeitsänderungen während einer Lichtantwort bestimmte. Seine Ergebnisse zeigen, daß L-Neurone keine lineare Kennlinie besitzen. Sowohl bei depolarisierenden als auch bei hyperpolarisierenden Strömen

besitzen sie gleichrichtende Eigenschaften. Dies wird allgemein als Hinweis auf spannungsabhängige Leitfähigkeiten gedeutet. Auch der "fast off transient" ist Ausdruck einer aktiven Membraneigenschaft und die Leitfähigkeitsänderungen während einer Lichtantwort sind zumindest während der Plateauphase nicht allein auf synaptische Eingänge seitens der Rezeptoren zurückzuführen (Wilson 1978b). Zu diesem Ergebnis kommt auch Simmons (1982b), der simultan Strom in Photorezeptoren injizierte und aus den nachgeschalteten L-Neuronen ableitete. Die depolarisierende langsame Welle bei Lichtende schließlich ist nach Wilson (1978b) auf Natrium- oder Kalziumströme zurückzuführen, die allerdings auch synaptischer Natur sein könnten. Aus Messungen des Dekrements der Lichtantwort schloß Wilson, daß die Weiterleitung der lichtinduzierten Potentialänderungen passiv erfolgt. Mit Hilfe morphologischer Daten schätzte er daraus ungefähre Werte für den Membranwiderstand ab.

Da diese Ergebnisse keine Rückschlüsse auf die genauen Membraneigenschaften zulassen, werden in dieser Arbeit vor allem drei Fragen untersucht.

- Erstens sollen die passiven Membraneigenschaften der L-Neurone methodisch genau bestimmt werden. Aus den Dekrementmessungen konnte Wilson (1978b) nur ungefähre Werte für den Membranwiderstand und die Längskonstante gewinnen, die außerdem auf der einschränkenden Voraussetzung einer passiven Weiterleitung der Lichtantworten

beruhen. Mit der Methode der Zeitkonstantenbestimmung aus Current-Clamp Experimenten läßt sich diese Annahme vermeiden, so daß methodisch einwandfreie Ergebnisse erhalten werden.

- Zweitens soll durch Voltage-Clamp Versuche eindeutig entschieden werden, ob die Membran der L-Neurone spannungsabhängige Leitfähigkeiten enthält, wie dies in den bisher genauer untersuchten nichtspikenden Neuronen festgestellt wurde.
- Drittens sollen diese eventuell vorhandenen Leitfähigkeiten pharmakologisch und quantitativ näher charakterisiert werden.

Da sich derartige Ergebnisse mit Hilfe morphologischer Daten besser interpretieren lassen, sollen zusätzlich auch histologische Methoden angewandt werden.

Durch die Kombination dieser verschiedenen Ansätze konnten als Ergebnis die Parameter der passiven Membran sehr genau bestimmt werden. Dies schafft eine fundierte Grundlage für zukünftige theoretische Untersuchungen. Durch die Voltage-Clamp Versuche wurden spannungs- und zeitabhängige Leitfähigkeitsänderungen nachgewiesen, die qualitativ und quantitativ beschrieben werden. Dabei war es möglich, zwei Membranströme pharmakologisch näher zu bestimmen. Da sich durch die pharmakologische Beeinflußung auch die Lichtantworten der L-Neurone veränderten, werden diese, obwohl sie schwer zu interpretieren sind, wiedergegeben.

Damit liegt eine Grundlage zu weiteren pharmakologischen Untersuchungen vor, die für Verschaltungsfragen von Bedeutung sind. Abschließend werden diese Ergebnisse mit denen anderer Neurone verglichen und die Konsequenzen für die Integrations- und Übertragungseigenschaften der L-Neurone diskutiert.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere und Präparation

Als Versuchstiere dienten weibliche und männliche, geschlechtsreife Wanderheuschrecken (Locusta migratoria L.) aus der Zucht des Zoologischen Institutes der Universität München, da kein geschlechtsspezifischer Unterschied in den Antworteigenschaften der L-Neurone festgestellt wurde.

Zur Präparation wurden die Tiere mit Insektennadeln fixiert und die Antennen entfernt. Das Innere der Kopfkapsel wurde durch einen Schnitt von der Oberkante der medianen Ocelluslinse zu den Oberkanten der lateralen Linsen von dorsal zugänglich. Das störende Fettgewebe und die den medianen Ocellusnerv umgebenden lateralen Luftsäcke, die das Unterschlundganglion mit Luft versorgen, wurden entfernt. Der große dorsomediane Luftsack, von dem Tracheen zu den Ocellen, den Komplexaugen und zum Oberschlundganglion ziehen, wurde mit einer feinen Nadel geöffnet. Dadurch kann die Außenluft direkt in das Tracheensystem des Gehirns eindringen. Dieser Punkt der Präparation erwies sich als äußerst wichtig, da ohne tracheale Luftversorgung der synaptischen Schicht im Ocellusbecher keine Übertragung der Rezeptorpotentiale auf die L-Neurone erfolgt. Deshalb ist es auch besonders wichtig, daß die Haupttrachee vom Oberschlundganglion zum Ocellus nicht verletzt wird.

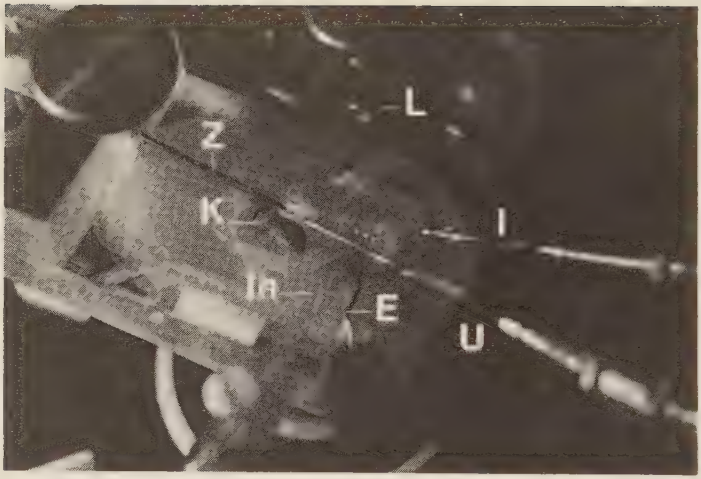


Abb.1. Präparat im Versuchsbecken. E = virtuelle Erde, I = Stromelektrode, In = indifferente Spannungselektrode, K = Heuschreckenkopf mit Ocellusnerv, der von unten mit Hilfe eines Plastiklichtleiters beleuchtet werden kann, L = Lichtleiter für Reizlicht, U = differente Spannungselektrode, Z = Ringerzufluß. Die Skala an der Präparatekammer besitzt eine Länge von 1 cm.

Abb.2. Querschnitt durch den medianen Ocellusnerv von Locusta migratoria. L = Axon eines L-Neurons, P = Perineurium, S = dünne Axone der sog. S-Neurone. Der Nerv ist etwas schräg geschnitten, wodurch sich die ovale Form ergibt. Semidünnschnitt in Phasenkontrastdarstellung.

Nach diesen Präparationsschritten hing der mediane Ocellusnerv frei in der Kopfkapsel zwischen Frons und Oberschlundganglion und es konnte prinzipiell aus ihm abgeleitet werden. Heftige Hämolymphbewegungen, hervorgerufen vor allem durch die Atembewegungen des Tieres, erschwerten stabile Ableitungen jedoch erheblich. Deshalb wurde durch einen rostro-caudalen Schnitt knapp unterhalb des Oberschlundganglions und einen dorsoventralen Schnitt hinter den Komplexaugen das gesamte, vordere obere Drittel der Kopfkapsel vom übrigen Körper getrennt. Dieser Teil, in dem sich der Luftsack, das Oberschlundganglion, die Komplexaugen und die Ocellen befinden, wurde in einem kleinen Wachsbecken festgesteckt und mit Heuschreckenringer bedeckt. Teilweise wurde noch die Cuticula an der rechten Seite zwischen Frons und Komplexauge entfernt, um so mehr Platz für die Ableitelektroden zu bekommen. Die derart präparierte Kopfkapsel diente nun gleichzeitig als Kammer, in der die Ringerlösungen ausgetauscht werden konnten. Durch ein Deckglas, welches das Wachsbecken abdeckte, wurde verhindert, daß die sehr geringe Flüssigkeitsmenge in der Kopfkapsel verdunstete. Schließlich wurde der Nerv von unten mit einem dünnen Plastikstab mechanisch unterstützt, der auch als Lichtleiter zur Beleuchtung bei der mikroskopischen Kontrolle diente. Die ganze Anordnung wurde an einem Leitz-Mikromanipulator in die Objektebene eines Mikroskopes gebracht und bei Bedarf mit rotem Durchlicht beleuchtet. Die verwendeten Objektive (6,3-fach und 2o-fach) besaßen weite Arbeitsabstände, so daß das Präparat gut zugänglich war (Abb.1).

	Normal-Ringer	4-Aminopyridin Ringer	Tetrodotoxin Ringer	Curare-Ringer	$CoCl_2$-Ringer	$CdCl_2$-Ringer	
NaCl	17o	17o	17o	17o	17o	17o	mM/l
Cholin-Cl	56	54	56	54	5o	36	mM/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8	1,8	1,8	1,8	-	1,8	mM/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	2	2	2	2	2	2	mM/l
KCl	5	5	5	5	5	5	mM/l
HEPES	2o	2o	2o	2o	2o	2o	mM/l
4-Aminopyridin	-	3	-	-	-	-	mM/l
Tetrodotoxin ..	-	-	1o	-	-	-	µM/l
Curare	-	-	-	3	-	-	mM/l
$CoCl_2$	-	-	-	-	8	-	mM/l
$CdCl_2$	-	-	-	-	-	2o	mM/l

Sämtliche Ringerlösungen wurden mit NaOH auf einen pH von 6,8 eingestellt.

Tab.2. Zusammensetzung der verschiedenen Ringerlösungen. d-Tubocurarin (Curare), Tetrodotoxin sowie 4-Aminopyridin stammten von der Fa. SIGMA Chemicals.

Da das Perineurium, welches die Axone umgibt, sehr widerstandsfähig ist (Abb.2), wurde vor dem eigentlichen Versuch der Ocellusnerv für eine Minute mit 1-%iger Proteaselösung (Sigma-Chemie, Protease V) überströmt. Dies erleichterte das Eindringen mit zwei Elektroden erheblich. Vorversuche zeigten, daß eine derartige Behandlung erst ab sieben Minuten Dauer die Lichtantwort der L-Neurone beeinflußt. Von solcherart präparierten Tieren konnte einige Stunden abgeleitet werden.

2.2 Verwendete Lösungen und Lösungswechsel

Die Zusammensetzung der verwendeten Ringerlösungen ist in Tab.2 wiedergegeben. Sämtliche Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.
Der Flüssigkeitswechsel erforderte viele Vorversuche, um die günstigste Methode herauszufinden. Schließlich wurden zwei exakt gekoppelte Glasspritzen verwendet, die über dünne PVC-Schläuche jeweils gleich viel Lösung zu- und ableiteten. Die Zuführung geschah dabei über eine Injektionsnadel direkt in die Kopfkapsel auf den Ocellusnerv, so daß aufgrund der Strömung die neue Lösung sofort den Nerv umspülte (Abb.1). Der Abfluß erfolgte unten aus der Kopfkapsel heraus. Das gesamte Volumen der Anordnung inclusive zuleitender Schläuche betrug o,8 ml, so daß bei einer durchschnittlichen Strömungsgeschwindigkeit von ca. o,5 ml pro Minute das gesamte Volumen in etwa zwei Minuten ausgetauscht werden konnte. Ständiger Lösungsfluß

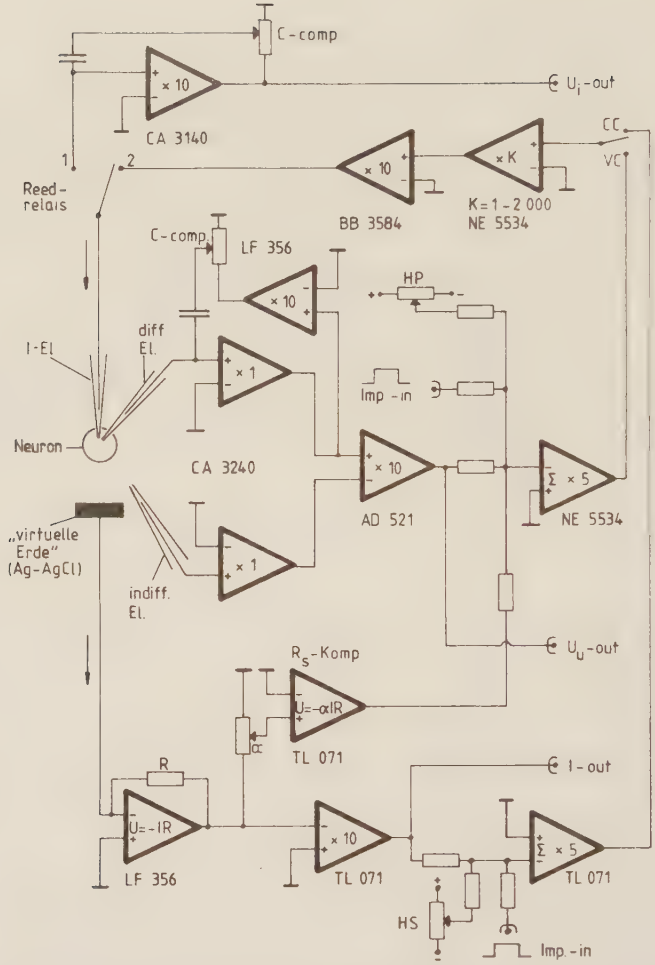


Abb.3. Schematischer Schaltplan des Current- und Voltage-Clamp Verstärkers. Die genaue Beschaltung wurde weggelassen. C-comp = Kapazitätskompensation, CC, VC = Umschaltung zwischen Current-Clamp und Voltage-Clamp, HP, HS = Einstellung des Haltepotentials bzw. des Haltestromes, Imp.-in = Eingänge für Kommandoimpulse, I-out = Stromproportionales Spannungssignal vom Strom-Spannungswandler (U=-IR, R = Rückkoppelungswiderstand des Strom-Spannungswandlers), R_s-Komp = Serienwiderstandskompensation. Eine stromproportionale Spannung (U=-αIR) wird dem Voltage-Clamp Summierer zugeführt, um den Serienwiderstand zu kompensieren (s. 2.3.3). U_i-out = Spannungssignal von der Stromelektrode (I - El.), gemessen gegen Erde. U_u-out = Spannungssignal von der Spannungselektrode (diff.El.), gemessen gegen die indifferente Elektrode (indiff.El.). 1, 2 = Umschaltung zwischen Spannungsmessung (1) und Strominjektion (2) durch die Stromelektrode. Die langen Pfeile geben den Stromweg wieder. Näheres siehe Text.

und Sauerstoffbegasung waren bei intakter Tracheenversorgung nicht notwendig, so daß die Gefahr einer mechanischen Störung der Ableitung nur während der kurzen Phase des Wechselns bestand. Durch einen Faradayschen Käfig wurde die Spülanordnung zusammen mit der Präparatekammer von elektromagnetischen Feldern abgeschirmt, um Einflüße auf die Strommessung der Clampanordnung zu vermeiden.

2.3 Elektrophysiologische Methoden

2.3.1 Current-Clamp und Voltage-Clamp Verstärker

Die ersten Versuche zur Widerstandsänderung während einer Lichtantwort wurden mit einem Mentor-N-95o-Ableitverstärker mit eingebauter Bridge-Balance durchgeführt. Da diese Methode mit Interpretationsschwierigkeiten behaftet ist und außerdem bei höheren Elektrodenwiderständen für eine gute zeitliche Auflösung zu langsam wird, wurde ein kombinierter Current- und Voltage-Clamp Verstärker selbst gebaut (Abb.3).
Die Eingangsstufe besteht aus zwei hochohmigen ($>1o^{12}$ Ω) FET-Operationsverstärkern (CA 324o) mit einem Eingangsfehlstrom von weniger als o,5 pA. Über die differente und die indifferente Elektrode wird die Spannung zwischen Zellinnerem und Ringerlösung gemessen. Durch einen echten Differenzverstärker (AD 521) gelangt das Signal an den negativen Eingang eines Summierers (NE 5534). Dort wird die gemessene Spannung zu einem externen Kommandosignal addiert.

Außerdem kann ein konstantes Haltepotential hinzugefügt werden. Die im Vergleich zu den Eingangsspannungen negative Ausgangsspannung des Summierers wird über einen Vorverstärker (NE 5534) mit regelbarer Verstärkung einem Hochspannungsverstärker (BB 3584) zugeführt. Der Summierer ist dabei in der Voltage-Clamp Anordnung der Punkt, an dem die negative Rückkopplung erfolgt. Die Ausgangsspannung des Hochspannungs-Operationsverstärkers liegt nämlich an der Stromelektrode, die sich ebenfalls intrazellulär befindet. Der dem Ausgangssignal dieses Verstärkers proportionale Strom erzeugt nun über der Zellmembran solange einen Spannungsabfall, bis die Summe aus gemessener Spannung und Kommandosignal Null ergibt. Damit ist der Voltage-Clamp Regelkreis geschlossen.
Der geflossene Strom wird über eine virtuelle Erde durch eine konventionelle Strom-Spannungswandlerschaltung (LF 356) mit nachgeschaltetem Verstärker (TL 071) gemessen.
Diese Anordnung wird durch Zuschaltung eines weiteren Summierers (TL 071) in einen Current-Clamp Verstärker umgewandelt, bei dem der Stromfluß einem Kommandosignal nachgeregelt wird. Über ein Potentiometer kann hier ein konstanter Haltestrom eingestellt werden.
Mittels eines Reedrelais ist es möglich, die Stromelektrode an einen weiteren hochohmigen Eingangsverstärker zu schalten (CA 3140), um sie alternativ auch zur Spannungsmessung zu verwenden. Beide Eingangsstufen sind mit Kapazitätskompensation ausgestattet, womit die Zeitkonstante der Spannungsmessung bei 50 MΩ-Elektroden auf 30 µs verringert wird.

2.3.2 Elektroden, Verstärkungsfaktor und Schwingneigung

Für stabile intrazelluläre Ableitungen waren Elektroden mit Widerständen von 3o-5o MΩ bei 2-molarer Kaliumacetatfüllung Voraussetzung.
Sie wurden auf einem Horizontalpuller aus Triangular-Tubing-Glas oder aus Borosilikatglas mit eingeschmolzenem Filament (Clark Biomed. Instruments) hergestellt und von hinten konventionell gefüllt. Die indifferente Elektrode, die aus einer abgebrochenen Glaselektrode bestand, wurde mit Agar in Normalringer gefüllt, wodurch Potentialänderungen während eines Lösungswechsels verhindert werden. Die virtuelle Erde, sowie sämtliche Elektroden wurden mittels Ag-AgCl-Drähten mit den Eingangsverstärkern verbunden.
Um die durch den Widerstand der Stromelektrode verursachte Differenz zwischen Kommandosignal und Zellpotential auf einen vernachlässigbaren Wert zu verringern und um die Schnelligkeit der Stromeinprägung zu erhöhen, sind hohe Verstärkungsfaktoren nötig (Katz & Schwartz 1974, Smith et al. 198o). Für Voltage-Clamp mit Mikroelektroden gilt die folgende Gleichung (Bezanilla et al. 1982):

$$U_m = \frac{U_{com} - IR_s - I(R_e + R_s)K^{-1}}{1 + K^{-1}} \qquad (Gl.1)$$

wobei U_m das Membranpotential, U_{com} das externe Kommandosignal, I den Strom, R_s den Serienwiderstand, R_e den Widerstand der Stromelektrode und K den Gesamtverstärkungsfaktor bedeuten.

Der Gesamtverstärkungsfaktor der Clampanordnung reicht von 5o-1ooooo-fach, wobei in den Versuchen im allgemeinen mit Verstärkungen von 8 ooo-fach bis 3o ooo-fach gearbeitet wurde. Bei Vernachlässigung des Serienwiderstandes folgt daraus bei einem durchschnittlichen Elektrodenwiderstand von 4o MΩ und einem Strom von 1oo nA ein Differenzfehler zwischen Kommandoimpuls und Membranspannung, der unter einem Millivolt liegt (s. Gl.1).

Bedingt durch die hohe Verstärkung neigt die ganze Anordnung - wie jeder Regelkreis - sehr leicht zum Schwingen. Dauert dies länger als ca. 1oo ms wird die Zelle irreversibel geschädigt. Die Schwingneigung wird vor allem durch die Zeitkonstanten der Zellmembran, der Elektroden und des Verstärkers bestimmt, von denen nur die des Verstärkers kontrolliert werden kann (Katz & Schwartz 1974). Die Zeitkonstanten der Elektroden sind vor allem abhängig vom Widerstand und der Eintauchtiefe in die Ringerlösung. Deshalb wurden möglichst niederohmige Elektroden verwendet und der Flüssigkeitsstand niedrig gehalten.

Die bis zu 13o V hohen Spannungsspitzen am Ausgang des Hochspannungsverstärkers, die zur schnellen Umladung der Membrankapazität notwendig sind, streuen sehr leicht in die Spannungselektrode ein. Dies führt zum Nachregeln der Clampanordnung und erzeugt ebenfalls unkontrolliertes Überschwingen. Aus diesem Grund müssen sämtliche Kabel sowie die Stromelektrode sorgfältig abgeschirmt werden. Bei der Stromelektrode geschah dies unter dem Mikroskop durch Auftragen von Leitsilber (Auromal 37M, Fa. Doduco)

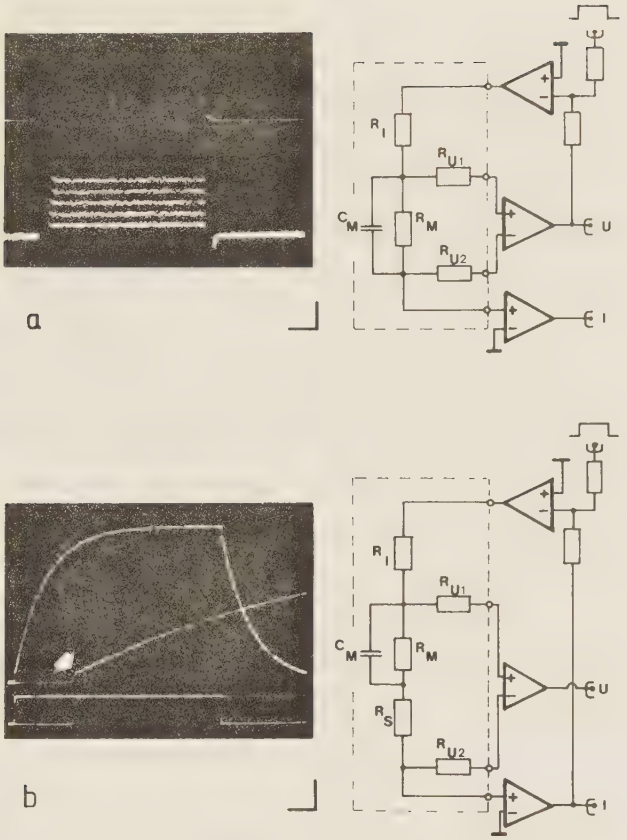


Abb.4. Simulationen mit Testschaltungen zur Kontrolle der Voltage- bzw. Current-Clamp Anordnung. Wie in allen folgenden Originalbildern von Voltage- oder Current-Clamp Versuchen zeichnet die obere Spur den Spannungsverlauf und die untere Spur den Stromverlauf auf.
Die Werte der Bauelemente in den Simulationsschaltungen betragen: C_M = Membrankapazität (4,7 nF), R_I = Widerstand der Stromelektrode (5o MΩ), R_{U1} = Widerstand der differenten Spannungselektrode (5o MΩ), R_M = Widerstand der Zellmembran (1 MΩ), R_S = Serienwiderstand (5o kΩ), R_{U2} = Widerstand der indifferenten Spannungselektrode (5o MΩ).
a: Voltage-Clamp Simulation. Links: Zeitverhalten der Anordnung (5 Oszillographenüberläufe); Rechts: Simulationsschaltbild.
b: Current-Clamp Simulation mit Serienwiderstand. Links: Zeitverhalten der Schaltung mit zwei verschiedenen Überlaufgeschwindigkeiten dargestellt. Der Pfeil kennzeichnet den momentanen Spannungsabfall, der durch den Serienwiderstand hervorgerufen wird.
Die Voltage-Clamp und Current-Clamp Verstärker sind in a und b sehr stark schematisiert. Kalibrierung: a. 5o mV, 5o nA, 2 ms. b. 2o mV, 1oo nA, 5 ms bzw. 5oo µs.

bis ca. 2oo µm Abstand von der Spitze. Diese Abschirmung wurde während des Versuches geerdet. In dem Bereich, in dem die Stromelektrode in die Ringerlösungen eintauchte, mußte zusätzlich eine Isolierschicht (Cyanacrylat) aufgebracht werden, da sich die Flüssigkeit auf virtueller Erde befinden muß.
Abb.4a zeigt das Verhalten der Voltage-Clamp Anordnung mit einer Testschaltung, die in etwa den Werten während eines Versuches entspricht. Die Simulationswiderstände für die Elektroden wurden relativ hoch gewählt und der Verstärkungsfaktor betrug 5o ooo-fach. Das simulierte Zellpotential erreicht innerhalb von 5oo µs den vom Kommandoimpuls vorgegebenen Wert. Der kapazitive Strom zur Umladung des Kondensators ist ebenfalls nach 5oo µs abgeklungen. In den Versuchen selbst wurden i.a. Zeitkonstanten von 1-3 ms erreicht.

2.3.3 Serienwiderstandskompensation

Da die L-Neurone in situ untersucht wurden, waren sie von Gliazellen umgeben, die den extrazellulären Raum an der Zellmembran beschränken. Dies bedeutet, daß ein nicht vernachlässigbarer Widerstand mit dem Membranwiderstand und der Membrankapazität in Reihe liegt. Dieser Serienwiderstand (R_s) verfälscht die Bestimmung der Membranspannung bei Stromimpulsen, da der Spannungsabfall zwischen Zellinnerem und Ringer gemessen wird (s. Abb. 4b und Gl.1).

Da dieser Widerstand spannungsunabhängig ist, kann man den verursachten Fehler durch eine einfache strompro-portionale Subtraktion am Summierverstärker der Voltage-Clamp Anordnung kompensieren (Hodgkin et al. 1952 und Abb.3). Da diese zusätzliche Schaltung jedoch weitere Schwingungs-probleme verursachte, war ein vollständiger Ausgleich meist nicht möglich. Deswegen wurde der Serienwiderstand i.a. nur zu ca. 5o % kompensiert. Messungen im Current-Clamp, bei denen sich der Serienwiderstand anhand des momentanen Spannungsabfalls beim Einsetzen des Stromes bestimmen läßt (Abb.4b), ergaben im Präparat Werte von 1o kΩ bis maximal 8o kΩ. Dies bedeutet, daß bei einem Strom von 1oo nA ohne R_s-Kompensation ein Spannungsmeßfehler von 1-8 mV entsteht (s. Gl.1).

2.3.4 Kontrolle von Doppelableitungen

Sämtliche Versuche wurden wegen der besseren Zugänglich-keit am medianen Ocellusnerv durchgeführt. Da die Axone der L-Neurone wegen des umgebenden Perineuriums nicht direkt einzusehen sind, konnte das Eindringen zweier Elek-troden in denselben Axon nicht visuell kontrolliert werden. Um trotzdem die Wahrscheinlichkeit von Doppelableitungen zu erhöhen, wurde der mechanische Aufbau der Elektroden-vortriebe verbessert. Beide Elektroden konnten dadurch mit großer Genauigkeit parallel vorwärts bewegt werden, nachdem sie mit Hilfe des Mikroskopes auf gleiche Höhe eingestellt wurden. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit,

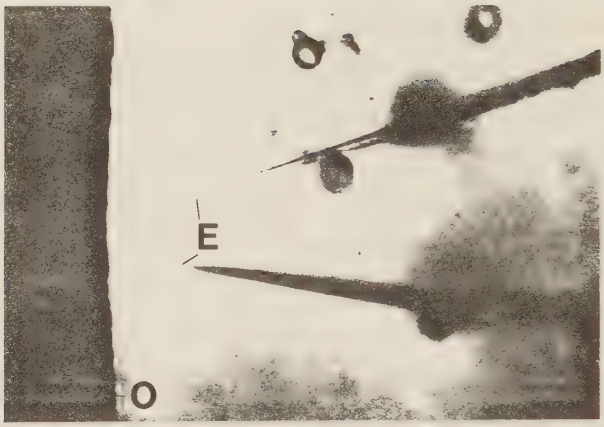


Abb.5. Justierung der Elektrodenspitzen (E) auf gleiche Höhe vor dem Eindringen in den Ocellusnerv (O). Skala: 2o µm.

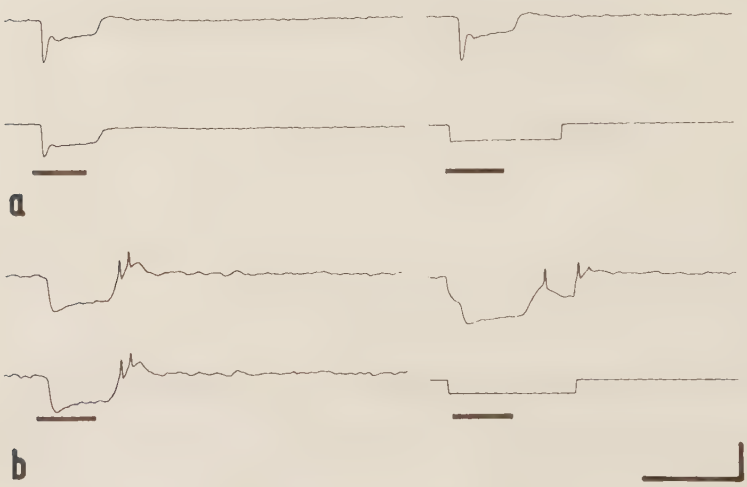


Abb.6. Kontrolle von Doppelableitungen aus einem L-Neuron.
a: Lichtantworten zweier verschiedener Zellen, von denen mit der Spannungselektrode (obere Spur) und der Stromelektrode (untere Spur) gleichzeitig abgeleitet wurde (links in a). Ein Stromimpuls durch die Stromelektrode (untere Spur) führt zu keinem Spannungsabfall in der anderen Zelle (obere Spur in der rechten Seite von a).
b: Befinden sich beide Elektroden in der gleichen Zelle, dann sind die Lichtantworten identisch (links) und ein Stromimpuls erzeugt einen Spannungsabfall an der Zellmembran (rechts).
Der schwarze Balken gibt die Dauer des Lichtreizes wieder. Kalibrierung: 2o mV, 2onA, 2oo ms

beim Eindringen in den Nerv dieselbe Zelle zu treffen (Abb.5).
Mit Lichtreizen wurde kontrolliert, ob sich die Elektroden intrazellulär befinden. Die lichtinduzierte Antwort der L-Neurone betrug im Sättigungsbereich zwichen 2o und 4o mV. Als Lichtquelle diente dabei eine 1oo W Halogenlampe. Die Lichtintensität konnte mit Neutralgraufiltern variiert werden. Mit Hilfe eines Lichtleiters wurde der mediane Ocellus in seiner ganzen Ausdehnung beleuchtet. Aufgrund der Lichtquelle war im Reizlicht nur sehr wenig UV vorhanden.
Anhand von drei Kriterien kann geprüft werden, ob beide Elektroden aus derselben Zelle ableiten (Abb.6):
- die Lichtantworten müssen absolut identisch sein
- spontane Zellpotentialschwankungen müssen übereinstimmen
- ein Stromimpuls durch die Stromelektrode verursacht einen großen Spannungsabfall an der Zellmembran.

2.4 Registrierung und Auswertung

Die gemessenen Werte wurden mit Kommentar auf ein TEAC R-71 oder TEAC R-81 FM-Kassettentonbandgerät aufgenommen. Die Bandbreite der Geräte beträgt 1.25 bzw. 5 kHz. Die Darstellung der Meßwerte erfolgte später auf einem Speicheroszillographen (Tektronix D 11) oder auf einem Schreiber (Gould Recorder 22o, Bandbreite 1oo Hz), von denen sie dann von Hand ausgewertet wurden. Die Stromantworten wurden teilweise mit einem 1 kHz Tiefpass gefiltert, da L-Neurone ein

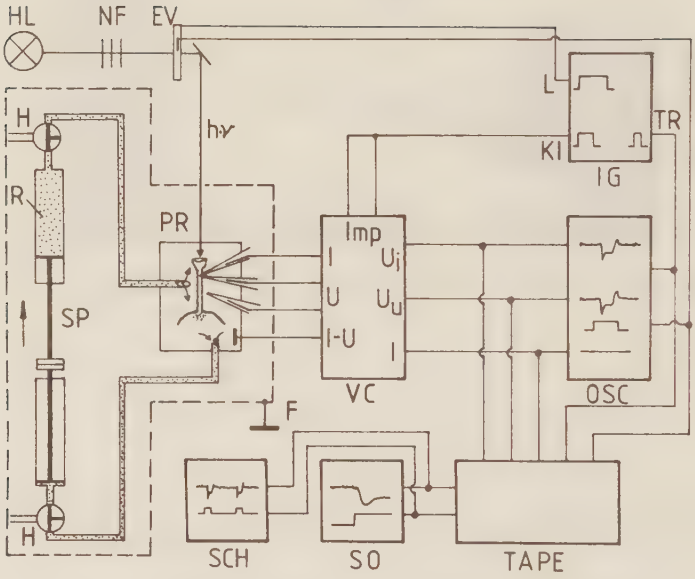


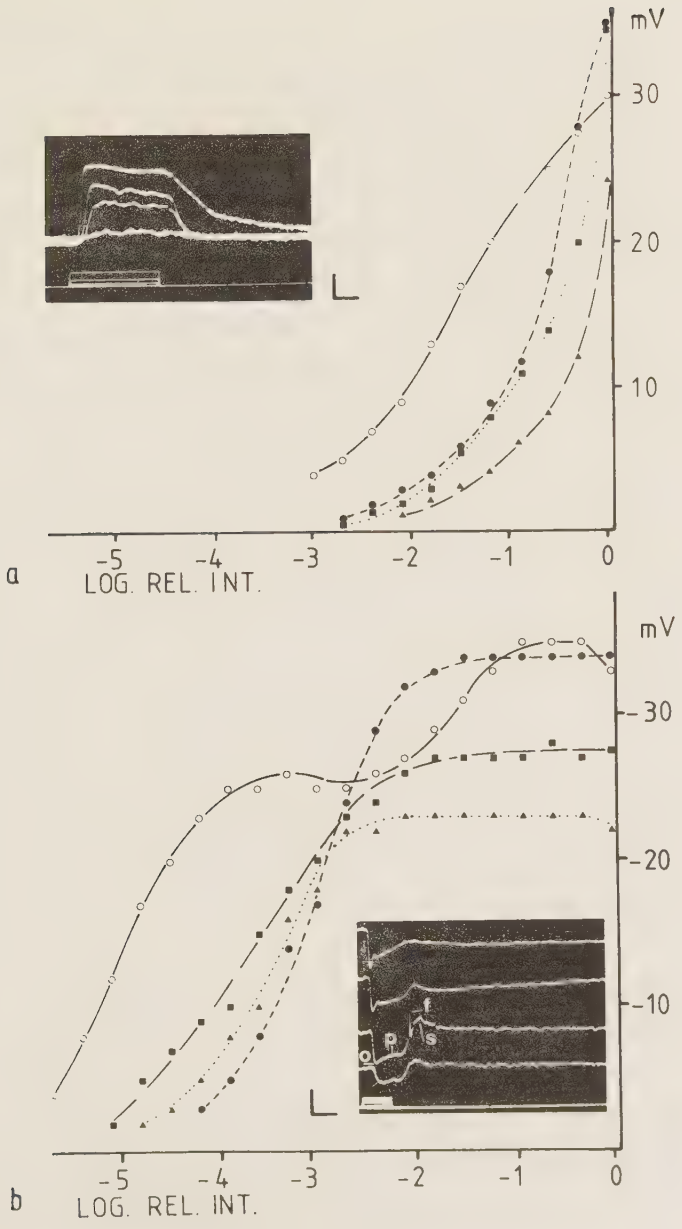
Abb.7. Schematischer Versuchsaufbau.
EV = elektromagnetischer Verschluß
F = Faradayscher Käfig
H = Hähne zum Wechseln der Ringerlösungen
HL = Halogenlampe
h·ν= Lichtleiter
IG = Impulsgenerator zur Erzeugung eines Triggerimpulses (TR), eines Impulses für den Verschluß (L) und eines Kommandoimpulses (KI)
NF = Neutralgraufilter
OSC= 4-Kanal Oscillograph
PR = Präparatekammer
R = Ringerlösung
SCH= 2-Kanal Schreiber
SO = 2-Kanal Speicheroscillograph
SP = mechanisch gekoppelte Spritzen zum Wechseln der Ringerlösungen
TAPE = 7-Kanal FM-Tonbandgerät
VC = Current- und Voltage-Clamp Verstärker mit Eingängen für Kommandoimpulse (Imp), Stromelektrode (I), Spannungselektrode (U) und virtuelle Erde (I-U) sowie Ausgängen für die gemessenen Spannungen an der Strom- (U_i) und der Spannungselektrode (U_u), und den gemessenen Strom (I)

sehr starkes Eigenrauschen aufweisen, das sich im Voltage-Clamp als starkes Stromrauschen bemerkbar macht.
Abb.7 stellt den ganzen Versuchsaufbau noch einmal schematisch dar.
Zur Bestimmung der Zeitkonstanten wurde die Methode der "peeled exponentials" angewandt (Rall 1969, 1977).
L-Neurone sind dafür sehr gut geeignet, da ihre Form stark dem zylindrischen Neuronmodell angenähert ist. Aus den Zeitkonstanten lassen sich die elektrotonische Länge und bei bekannter Geometrie die Längskonstante, der Membranwiderstand, die Membrankapazität und der spezifische Innenwiderstand bestimmen (Rall 1977, s.a. 3.2.5).
Bis auf zwei Ausnahmen, die im Text erwähnt werden, wurden sämtliche Ergebnisse dieser Arbeit jeweils an mindestens fünf verschiedenen Präparaten reproduziert. Da sich die einzelnen Neurone quantitativ allerdings beträchtlich unterschieden, wurden Mittelwerte nur dort bestimmt, wo dies sinnvoll erschien.

2.5 Histologie

Um die Abmessungen der Zellen genau bestimmen zu können, wurde in zehn Fällen über die Stromelektrode Lucifer Yellow (Sigma Chemie) in die Neurone injiziert. Die Stromelektroden waren dabei mit 5 %-iger Lucifer Yellow Lösung gefüllt und zeigten Widerstände von 90-300 MΩ. Voltage-Clamp Versuche konnten mit diesen hochohmigen und schnell verstopfenden Elektroden nicht durchgeführt werden.

Zur Längenbestimmung wurde nach dem Versuch das ganze, noch vitale Präparat unter dem Mikroskop (Zeiss Ultraphot II) bei Auflichtfluoreszenz betrachtet, und die Zelle ausgemessen. Zur genaueren Vermessung der Verzweigungen dienten anschließend hergestellte Schnitte. Dazu wurde das Präparat durch eine 4%-ige Paraformaldehydlösung in o,1 M Phosphatpuffer (pH 7,3) eine Stunde lang fixiert. Danach wurden entweder konventionelle Paraffinschnitte oder Gefrierschnitte hergestellt. Die Schnittdicke betrug in beiden Fällen ca. 3o µm. Zur Herstellung der Gefrierschnitte wurde der ganze Kopf in Cryomatrix^{TM} (Shandon) eingebettet und auf einem Bright Cryostat OTF/AS bei -36 ^{o}C geschnitten.



Legende siehe rechts.

3. ERGEBNISSE

3.1 Lichtinduzierte Potentialänderungen

Um die Intaktheit der Präparate zu kontrollieren, wurden zu Beginn jedes Versuchs die normalen Lichtantworten registriert. Abb.8 zeigt Beispiele für die Abhängigkeit der lichtinduzierten Potentialänderungen der Rezeptoren und der L-Neurone von der Intensität eines unbunten Lichtreizes.

Rezeptoren, von denen im Ocellusbecher abgeleitet wurde, depolarisieren bei Reizung durch einen Lichtblitz. Bei höheren Intensitäten sinkt die Antwort am Ende des Lichtreizes nicht sofort auf das Ruhepotential, sondern es bleibt längere Zeit ein positives Nachpotential vorhanden (Abb.8a, inset). Der Sättigungsbereich konnte mit den vorhandenen Lichtintensitäten nicht erreicht werden, so daß

Abb.8. Abhängigkeit der Lichtantworten von Rezeptoren (a) und L-Neuronen (b) vom Log. der relativen Lichtintensitäten. Gemessen wurde jeweils das Maximum der Lichtantworten, bei den L-Neuronen die Amplitude der hyperpolarisierenden on-Spitze.
Geschlossene Symbole: Antworten auf 16o ms lange Lichtreize mit 1 s Dunkelpause dazwischen.
Offene Symbole: Antworten auf gleich lange Lichtreize mit 1o s Dunkelpause dazwischen.
Die Kurven sind von Hand den Meßpunkten angepaßt.
inset a: Originalregistrierung der Lichtantworten (obere Spur) eines Rezeptors bei rel. Intensitäten von -2,7; -1,5; -o.6; und O, sowie langer Dunkelpause dazwischen.
inset b: Lichtantworten eines L-Neurons bei rel. Intensitäten von -5,1; -3,9; -2,1; -1,8 und langer Dunkelpause. Die Oscillographenspur wurde der besseren Übersichtlichkeit halber mit steigender Lichtintensität nach oben verstellt. In der dritten Spur von oben sind die Phasen der Lichtantwort gekennzeichnet. o = on-Spitze, p = Plateauphase, f = "fast off transient", s = "slow off transient".
Die unteren Spuren in den insets geben die Länge der Lichtreize an. Kalibrierung: a. 1o mV, 5o ms.
b. 2o mV, 1oo ms.

die Maximalamplitude noch über den in Abb.8a gezeigten 35 mV liegen dürfte. Die Empfindlichkeit hängt außerdem sehr stark vom Adaptationszustand der Rezeptoren ab. Bei längeren Pausen zwischen den einzelnen Reizen ist der lineare Bereich der Intensität-Antwort-Kurve in Richtung niederer Intensitäten verschoben (Abb.8a).

Im Gegensatz zu den Rezeptoren wurde der Sättigungsbereich der L-Neurone mit den verwendeten Lichtintensitäten erreicht, obwohl das Empfindlichkeitsmaximum der L-Neurone im UV liegt, das in der verwendeten Lichtquelle nur sehr wenig vorhanden war (Wilson 1978a). Bei mittleren Intensitäten erhält man die in der Literatur beschriebene typische Lichtantwort mit hyperpolarisierender on-Spitze und Plateauphase, sowie depolarisierendem "fast off transient" und "slow off transient" (Abb.8b, inset). Man erkennt, daß das Auftreten der verschiedenen Phasen sehr stark von den Reizintensitäten abhängt. Es existieren auch beträchtliche Unterschiede zwischen den verschiedenen L-Neuronen (s. Abb.6). Bei höheren Lichtintensitäten stellt sich - entsprechend den Rezeptoren - ein langes, in diesem Fall negatives Nachpotential ein, das mehrere Sekunden lang anhalten und einen komplizierteren Zeitverlauf zeigen kann (Abb.8b, inset und Abb.36a). Der lineare Bereich der Intensität-Antwort-Kurven ist im Vergleich zu den Rezeptoren stark zu niederen Intensitäten hin verschoben. Auch hier steigern längere Adaptationspausen die Empfindlichkeit der Zellen beträchtlich (Abb.8b).

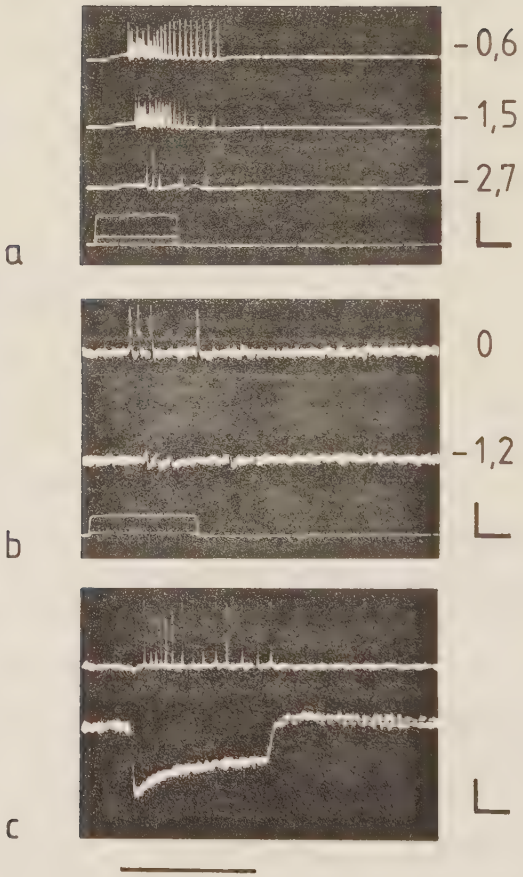


Abb.9. a und b: Lichtantworten von spikenden Neuronen bei verschiedenen Lichtintensitäten (jeweils rechts angezeigt). Die Oszillographenspur wurde für jeden Überlauf verschoben. Die unterste Spur gibt jeweils die Lichtreize wieder.
c: Simultane Ableitung von spikendem Neuron und L-Neuron im selben Präparat. Lichtintensität -2,1. Der Balken symbolisiert die Länge des Lichtreizes. Kalibrierungen: a. 5o mV, 5o ms. b und c. 1o mV, 5o ms.

Zusätzlich zu den L-Neuronen konnte im Ocellusnerv auch von spikenden Zellen abgeleitet werden. Davon gibt es offensichtlich unterschiedliche Typen, da z.B. die Zelle in Abb.9a phasisch reagiert, während das Neuron in Abb.9b ein on-off-Verhalten zeigt. Gleichzeitige Ableitungen von L-Neuronen und spikenden Zellen zeigen die Intaktheit des Präparates und die Koexistenz von spikenden und nicht-spikenden Nervenzellen in demselben Neuropil (Abb.9c). Von den spikenden Zellen konnte im allgemeinen nur wenige Sekunden bis Minuten lang abgeleitet werden, so daß die Vermutung anderer Autoren, es handle sich dabei um Ableitungen von den dünnen Axonen im Nerv, unterstützt wird (Wilson 1978a, Simmons 1982b). Vor jedem Eindringen in eine spikende Zelle wurden kleine, extrazelluläre Aktionspotentiale beobachtet, während dies vor dem Eindringen in ein L-Neuron nie der Fall war.

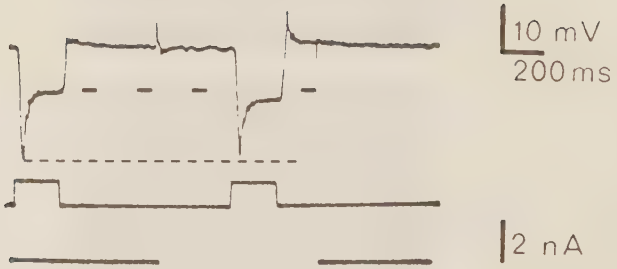


Abb.1o. Lichtantwort eines L-Neurons ohne und mit negativem Konstantstromimpuls in Bridge-Balance-Technik.
Obere Spur: Zellpotential
Mittlere Spur: Lichtreize
Untere Spur: Stromregistrierung. Das Ein- und Ausschalten des Stromreizes erzeugt in der oberen Spur nur kapazitive Zacken, d.h. die Bridge-Balance ist sehr gut abgeglichen. Um den Vergleich der beiden Lichtantworten zu erleichtern, sind auf den Niveaus der on-Spitze und des Plateaus der ersten Lichtantwort horizontale Linien eingezeichnet.

3.2 Current-Clamp Experimente

3.2.1 Current-Clamp mit einer Elektrode und Bridge-Balance

Abb.1o zeigt den Einfluß einer Konstantstromeinprägung auf die lichtinduzierte Antwort eines L-Neurons. In dieser Art von Versuchen wird mit einer Elektrode von der Zelle abgeleitet und durch dieselbe Elektrode Strom injiziert. Der Strom verursacht an den Widerständen der Elektrode und der Zellmembran einen Spannungsabfall. Durch eine elektronische Brückenschaltung (Bridge-Balance) kann dieser Spannungsabfall kompensiert werden, so daß trotz Stromfluß keine Änderung der gemessenen Spannung vorliegt (Fein 1966, Park et al. 1983). Dies zeigt sich in Abb.1o beim Ein- und Ausschalten des Stromes, der in der oberen Spannungsregistrierung nur kapazitive Zacken erzeugt. Ändert sich nun bei konstantem Elektrodenwiderstand der Zellmembranwiderstand, gerät die Kompensation aus dem Gleichgewicht und es ergibt sich eine Spannungsänderung, die der Widerstandsänderung proportional ist. Damit werden im einfachsten Fall mit dieser Methode Widerstandsänderungen gemessen. Bei Nervenzellen muß man allerdings den Einfluß der elektromotorischen Kraft auf die Ionenströme berücksichtigen, so daß derartige Versuche sehr schwer zu interpretieren sind (s. 3.2.2).
Aus Abb.1o ist erkennbar, daß sich die Lichtantwort des L-Neurons während eines Stromimpulses von der ohne Stromeinprägung unterscheidet. Die on-Spitze wird mit Impuls

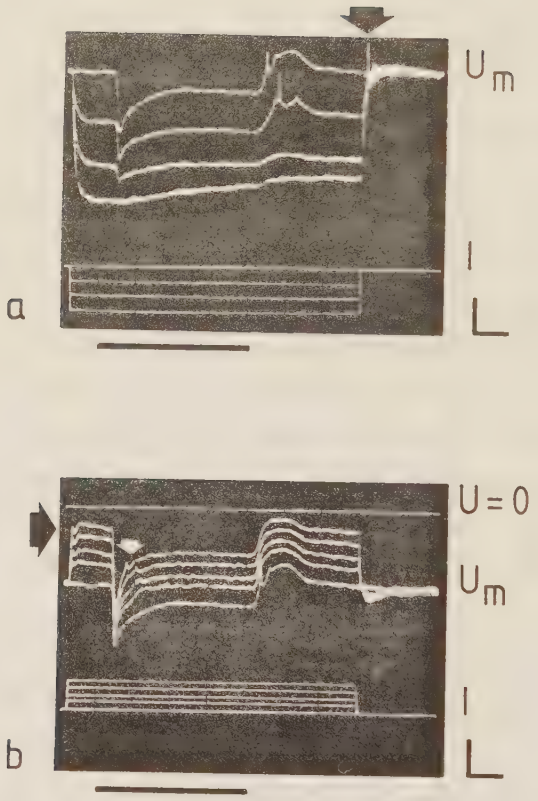


Abb.11. a: Lichtantworten eines L-Neurons während hyperpolarisierender Stromimpulse zunehmender Stärke. Überlagerung von vier Oszillographenüberläufen. Bei der stärksten Stromamplitude wird das Umkehrpotential der synaptischen Übertragung erreicht. Pfeil: "Aktionspotentiale" nach Ende der Stromimpulse.
b: Wie a, aber depolarisierende Stromimpulse zunehmender Amplitude. Pfeile: Lokale Antworten nach dem Einsetzen der Stromimpulse bzw. beim Übergang von der on-Spitze zur Plateauphase. Fünf Oszillographenüberläufe.
Die Balken geben jeweils die Dauer der Lichtreize an. (U=0) = Nullpotential, U_m = Zellpotential, I = Stromstärke. Die Grundlinie bezeichnet I = 0. Kalibrierungen: a und b. 2o mV, 5o nA, 5o ms.

etwas kleiner, das Plateau etwas größer und nach Ende des Lichtreizes entsteht ein "fast off transient", der bei dieser Zelle vorher nicht vorhanden war. Aus diesen gegensätzlichen Effekten muß man schließen, daß mindestens zwei verschiedene Mechanismen an der Veränderung der Lichtantwort beteiligt sind.

3.2.2 Current-Clamp mit zwei Elektroden

Beim Current-Clamp mit zwei Elektroden mißt man mit der einen Elektrode die Spannung und injiziert mit der zweiten Elektrode Strom in die Zelle. Da man mit dieser Anordnung höhere Stromstärken einsetzen kann und mit der anderen Elektrode den Spannungsabfall an der Zellmembran direkt mißt, erlaubt dies genauere Aussagen über die in Abb.1o vorliegenden Mechanismen.
Abb.11 zeigt das Ergebnis eines im Gegensatz zu Abb.1o mit zwei Elektroden durchgeführten Current-Clamp Versuches mit gleichzeitiger Lichtreizung.
Durch hyperpolarisierende Ströme vom Ruhepotential aus wird die Lichtantwort kleiner und verschwindet beim stärksten negativen Stromimpuls praktisch völlig, da das Zellpotential offensichtlich in die Nähe des Umkehrpotentials der synaptischen Ionenströme gerät (Abb.11a). Der Wert des durchschnittlichen Umkehrpotentials für alle dahingehend untersuchten L-Neurone beträgt -86 ±13 mV (n = 18). Dieser Mittelwert liegt 45 mV unter dem durchschnittlichen Ruhepotential der L-Neurone, das -41 ±1o mV (n = 31) beträgt.

Mit Hilfe des Umkehrpotentials läßt sich die kleinere on-Spitze in Abb.1o bei negativem Strom erklären. Weitere Effekte in Abb.11 deuten jedoch auf spannungsabhängige Prozesse hin. Der "fast off transient" nach Ende des Lichtreizes wird bei schwächeren hyperpolarisierenden Strömen größer und im "slow off transient" zeigt sich ein zweiter, kleinerer "fast off transient". Bei stärkeren negativen Strömen verschwindet der "fast off transient" und die Amplitude des "slow off transient" wird kleiner. Beim stärksten dargestellten negativen Strom erkennt man außerdem, daß der Spannungsabfall an der Zellmembran am Anfang des Stromimpulses größer ist, als am Ende des Stromreizes. Schließlich treten am Ende der Stromimpulse zwei weitere schnelle Potentialänderungen auf, die wie "anode-breakdown-spikes" aussehen (Pfeil in Abb.11a).

Nach den Einsetzen depolarisierender Stromimpulse steigt die Spannung bedeutend schneller an, als bei negativen Impulsen, und es zeigt sich eine aktive Membranerregung in Form einer lokalen Antwort (Pfeil in Abb.11b). Diese war allerdings nicht bei allen L-Neuronen vom Ruhepotential aus erzeugbar. Weitere lokale Antworten erscheinen bei den stärkeren Stromimpulsen am Übergang von der on-Spitze zur Plateauphase. Der "fast off transient" verschwindet bei depolarisierenden Impulsen völlig (Abb.11b) Am Ende sowohl hyper- als auch depolarisierender Ströme werden außerdem kleine Nachpotentiale jeweils umgekehrter Polarität erzeugt (Abb.11a,b).

Aus diesen Versuchen wird deutlich, daß sich durch Stromeinprägung aktive Membranprozesse erregen lassen, die zusammen mit einer lichtinduzierten Potentialänderung relativ komplexe Phänomene ergeben.
Zur näheren Untersuchung wurden weitere Current-Clamp Experimente ohne Lichtreizung durchgeführt, um die Effekte der Lichtantwort abzutrennen.
Dabei wird im weiteren Verlauf zwischen "schnellen" und "langsamen" Potentialänderungen bzw. Strömen unterschieden. Diese Termini sollen sich aber nur auf die Vorgänge in den Current-Clamp und den folgenden Voltage-Clamp Versuchen und nicht auf die lichtinduzierten Vorgänge beziehen. Als "schnell" werden Vorgänge bezeichnet, die in einem Zeitbereich <1o ms ablaufen, während "langsame" Vorgänge bis zu mehreren Sekunden dauern können.

3.2.3 Schnelle Potentialänderungen im Current-Clamp

Daß es sich bei den schnellen Potentialänderungen am Ende der hyperpolarisierenden Stromimpulse von Abb.11 um eine Form von Aktionspotentialen handelt, zeigen die Abb.12 und 13a. Der Ausdruck "Aktionspotential" wird dabei einstweilen mit Vorbehalt verwendet, da dieser Vorgang rein phänomenologisch nicht mit normalen Aktionspotentialen, wie sie von anderen Neuronen bekannt sind, identisch ist. Außerdem soll auch weiterhin zwischen dem durch Stromimpulse erzeugten "Aktionspotential" und dem durch Lichtreize erregten "fast off transient" unterschieden werden.

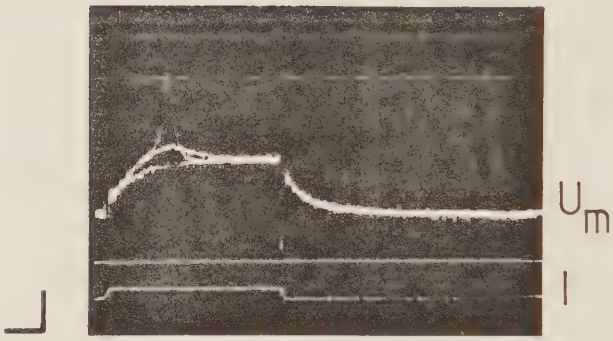


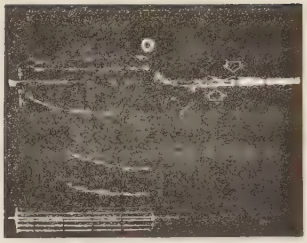
Abb.12. Positive Stromimpulse bei einem konstanten Haltestrom von -45 nA. Das Neuron wurde dadurch vom Ruhepotential von -35 mV auf -7o mV hyperpolarisiert. Drei aufeinanderfolgende positive Impulse mit jeweils leicht stärkerer Amplitude erzeugen zuerst eine rein passive Potentialänderung, dann eine lokale Antwort und schließlich ein "Aktionspotential". U_m = Membranpotential, I = Stromstärke. Die mittlere Spur zeigt I = 0 an. Kalibrierung: 10 mV, 50 nA, 1o ms.

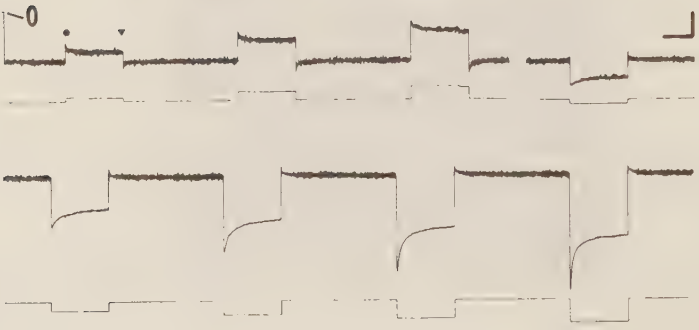
Abb.12 stellt die Ableitung an einer Zelle dar, die durch einen konstanten Haltestrom auf -7o mV vorpolarisiert wurde. Von diesem Spannungsniveau erregten leicht zunehmende, depolarisierende Impulse zuerst eine passive Antwort, dann eine lokale Antwort und schließlich ein "Aktionspotential". Das Neuron befand sich dabei in $CoCl_2$-Ringer, um Kalziumströme zu unterdrücken (s. 3.3.4.1).

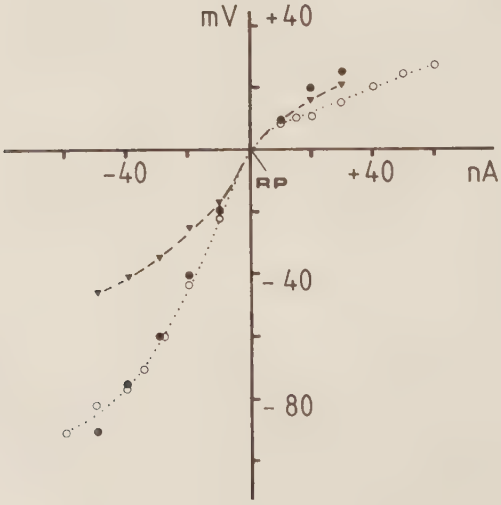
Die Schwelle für das "Aktionspotential" liegt - wie in allen anderen Fällen auch - bei etwa -65 mV, und das Amplitudenmaximum bei ca. -35 mV. In sämtlichen untersuchten L-Neuronen erreichte das Potential nie das Spannungsnullniveau und hatte i.a. eine Amplitude unter 3o mV. Im Vergleich zu anderen Nervenzellen bedeutet die relativ negative Schwelle, daß das normale Ruhepotential der L-Neurone darüber liegt, und deshalb durch Depolarisationen vom Ruhepotential aus keine Erregung hervorgerufen werden kann. Unter der hypothetischen Annahme eines Na-"Aktionspotentials" kann man außerdem folgern, daß die Kanäle beim Ruhepotential zum größten Teil inaktiviert sind (Hille 1977).

3.2.4 Strom-Spannungs-Kennlinie bei verschieden langen Stromimpulsen

In Abb.13c sind die Strom-Spannungs-Kennlinien der L-Neurone von Abb.13a,b dargestellt. Dabei wird der durch Stromimpulse verursachte Spannungsabfall über der Zellmembran gegen die Stromstärke aufgetragen. Der Nullpunkt entspricht dem Ruhepotential.







Legende siehe rechts.

Im Falle des Neurons in Abb.13b wurden sehr lange Stromimpulse gegeben, die bei stärkeren Hyperpolarisationen einen zeitabhängigen Spannungsabfall erzeugen. Nach einem anfänglichen Maximum (t < 1oo ms) wird der Spannungsabfall bei längeren Zeiten immer geringer (t > 1oo ms). Dieses Phänomen, das auch von Wilson (1978b) beschrieben wurde, entspricht der sog. "anormalen Gleichrichtung" anderer Nervenzellen (Kandel & Tauc 1966, Nelson & Frank 1967, Hagiwara et al. 1976, Fukushima 1981, Werblin 1975). In das Strom-Spannungs-Diagramm von Abb.13c wurden deshalb für diese Zelle die Spannungsabfälle bei zwei verschiedenen Zeiten eingetragen. In depolarisierender Richtung vom Ruhepotential aus zeigt sich in Abb.13c ein weiterer Gleichrichteffekt, der der "verzögerten Gleichrichtung" anderer Nerven- und Muskelzellen ähnelt. Auch dort ist i.a. der Widerstand positiv vom Ruhepotential geringer als in

Abb.13. Bestimmung der Strom-Spannungs-Kennlinie aus Current-Clamp Versuchen mit kurzen und langen Stromimpulsen.
a: Potentialänderungen (U_m) auf kurze Stromimpulse (I) positiver und negativer Polarität. Die Zelle befindet sich auf Ruhepotential. U = 0 zeigt das Nullpotential an. Die beiden Pfeile kennzeichnen die Hyperpolarisation nach dem ersten "Aktionspotential", das am Ende des stärksten Stromimpulses entsteht, und die nachfolgende lokale Antwort. Das zweite "Aktionspotential" entsteht als Folge des zweitstärksten negativen Impulses, während der schwächste Impuls keine aktive Erregung erzeugt. Lokale Antworten sind auch am Anfang der positiven Spannungsabfälle erkennbar. O = 45ms nach Impulsanfang für die Meßpunkte in c. Sechs Oszillographenüberläufe.
b: Lange Stromimpulse (jeweils untere Spur) und die dadurch erzeugten Potentialänderungen (jeweils obere Spur). In negativer Richtung ausgeprägte anormale Gleichrichtung. 0 = Nullpotential. ● = 2oo ms und ▼ = 3,8 s nach Impulsanfang für die Meßpunkte in c.
c: Strom-Spannungskennlinien der Zellen von a und b, gemessen zu den dort angegebenen Zeiten. Die Kurven sind von Hand den Meßwerten angepaßt. RP=Ruhepotential
Kalibrierungen: a. 2o mV, 1oo nA, 1o ms.
b. 2o mV, 5o nA, 2 s.

hyperpolarisierender Richtung (Hodgkin et al. 1952, Nakajima et al. 1962). Der Eingangswiderstand der L-Neurone von Abb.13a,b, der aus den Spannungsabfällen bei kleinen negativen Strömen bestimmt wurde, hatte in diesen beiden Fällen einen Wert von 2 MΩ und betrug bei den verschiedenen untersuchten Zellen 0,8-3,2 MΩ.

Die Kurven in Abb.13c zeigen deutlich, daß neben den schnellen Potentialänderungen auch langsame zeit- und spannungsabhängige Vorgänge in L-Neuronen ablaufen. Die Kennlinie ist für längere Zeiten als ca. 2oo ms praktisch nur in einem kleinen Bereich vom Ruhepotential bis etwa 15 mV negativ davon linear, das heißt, bei allen anderen Spannungen treten aktive Membraneigenschaften in Erscheinung. Für kürzere Zeiten (z.B. die Werte für 45 ms in Abb.13c) ist die Kennlinie in negativer Richtung dagegen bis zu ca. 6o mV unter dem Ruhepotential linear. Daraus folgt, daß die genaue Form der Strom-Spannungs-Kennlinie stark zeitabhängig ist, und daß die "anormale Gleichrichtung" erst nach längerer Zeit das Membranpotential stärker beeinflußt. Die normale Gleichrichtung in depolarisierender Richtung ist dagegen auch bei Zeiten unter 4o ms wirksam, wie man anhand von Abb.13a sieht. Schließlich fällt in Abb.13b noch auf, daß das Rauschen des L-Neurons bei negativen Strömen beträchtlich verringert wird.

3.2.5 Passive Membraneigenschaften

Aus dem Zeitverlauf des gemessenen Spannungsabfalls, der durch Stromimpulse an der Zellmembran hervorgerufen wird, lassen sich die passiven Membraneigenschaften eines Neurons bestimmen. Die angewandte Methode basiert dabei auf theoretischen Untersuchungen von Rall (1969, 1977). Als Folge eines Stromimpulses entwickelt sich die Spannung an einem zylindrischen Neuronmodell als Summe exponentieller Anteile:

$$U(t) = C_o e^{-\frac{t}{\tau_o}} + C_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + \ldots. C_n e^{-\frac{t}{\tau_n}} + \text{const.} \quad \text{(Gl.2)}$$

wobei U(t) das Membranpotential zur Zeit t als Antwort auf einen Konstantstromreiz darstellt ($U(t) = U_m - E_r$; U_m = Membranpotential, gemessen intrazellulär gegen extrazellulär; E_r = Ruhepotential). C_o .... C_n bilden Konstanten, die von den Anfangsbedingungen abhängen, und τ_1 ... τ_n sind die sog. "ausgleichenden" Zeitkonstanten. Sie treten in Erscheinung als Folge axialer Ströme, die bei ungleichmäßiger Stromverteilung benachbarte Membranbezirke umladen. Ihre jeweilige Größe hängt von der Geometrie des Neurons ab. Im theoretischen Fall eines unendlichen Membranzylinders mit gleichmäßiger Stromverteilung im Innern des Zylinders werden alle Koeffizienten $C_1 \ldots C_n$ zu Null, so daß sich die Gl.2 zu $U(t) = C_o e^{-t/\tau_o} + \text{const.}$ reduziert. Dabei bezeichnet $\tau_o = \tau_m$ die Membranzeitkonstante

$$\tau_m = R_m \cdot C_m \quad \text{(Gl.3)}$$

mit R_m, dem spezifischen Flächenwiderstand und C_m, der Kapazität pro Flächeneinheit der Membran.

Die Zeitkonstanten $\tau_0 \ldots \tau_n$ lassen sich prinzipiell durch halblogarithmisches Auftragen der Spannung gegen die Zeit bestimmen. In der Praxis ist dies allerdings meist nur für τ_0 und τ_1 möglich, da die folgenden Zeitkonstanten i.a. zu kurz sind, um sie noch messen zu können. Die genauen Voraussetzungen für diese Art der Auswertung sind in Rall (1969) beschrieben (s.auch Abb.15).
Im Falle eines endlichen Membranzylinders läßt sich aus dem Verhältnis der Zeitkonstanten die elektrotonische Länge

$$L = \frac{x}{\lambda} = n \cdot \pi \left(\frac{\tau_0}{\tau_n} - 1\right)^{-\frac{1}{2}} \qquad (G1.4)$$

errechnen. Dabei bedeutet x die Länge des Membranzylinders und λ die Längskonstante, wobei

$$\lambda = \sqrt{R_m d \,/\, 4R_i} \qquad (G1.5)$$

mit R_i, dem spezifischen Innenwiderstand des Membranzylinders und d, seinem Durchmesser. Außerdem gilt - wieder unter der Voraussetzung eines endlichen Membranzylinders - die Gleichung

$$R_m = \frac{R_n A_n \tanh L}{L} \qquad (G1.6)$$

mit R_n, dem Eingangswiderstand und A_n, der Oberfläche des Zylindermodells.
Aus diesen Gleichungen lassen sich die passiven Membranparameter eines Neurons vollständig bestimmen. Experimentell geht man dabei so vor, daß man aus Current-Clamp Versuchen den Eingangswiderstand R_n und die Zeitkonstanten τ_0 und τ_1

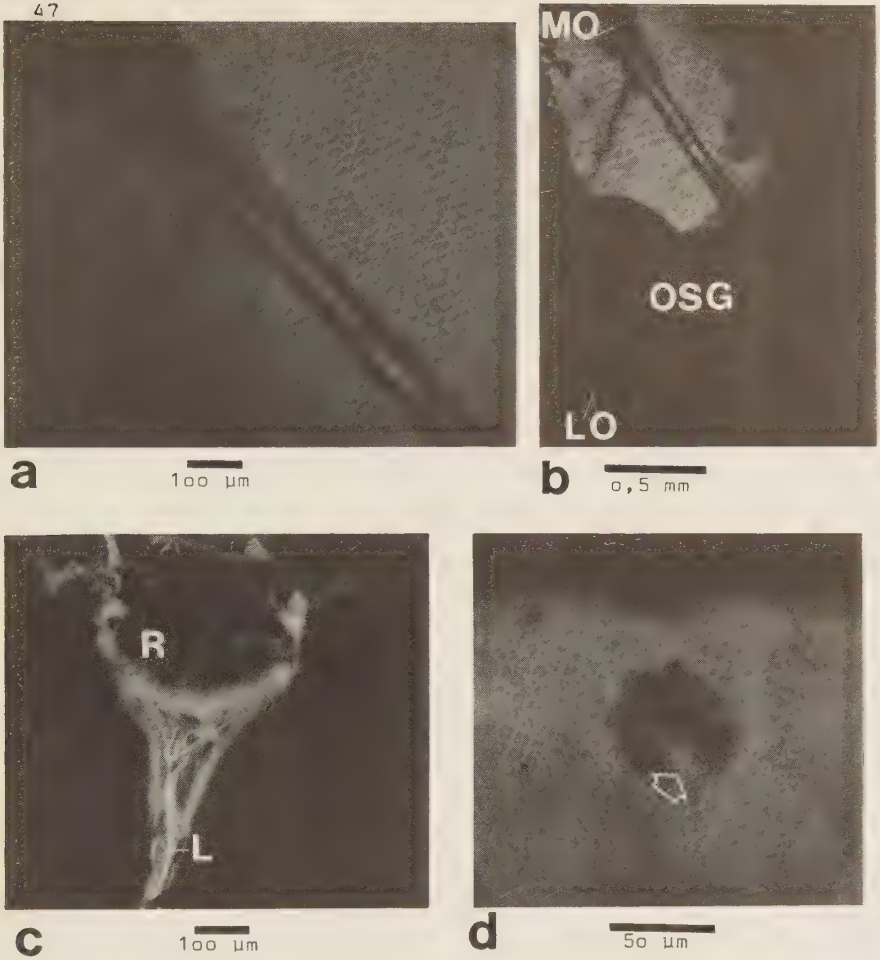


Abb.14. Lucifer-Yellow-injizierte L-Neurone. Auflicht-fluoreszenz.
a: Axon eines L-Neurons im Ocellusnerv. Im Nerv selbst sind keine Verzweigungen erkennbar.
b: Dasselbe Neuron wie in a, in seiner ganzen Ausdehnung. Es handelt sich um ein mediolaterales L-Neuron. LO = linker lateraler Ocellus, der etwas außerhalb der Schärfenebene liegt. MO = medianer Ocellus. OSG = Oberschlundganglion.
Die Aufnahmen von a und b erfolgten direkt nach Versuchsende am noch vitalen Präparat.
c: Längsschnitt durch den medianen Ocellus zur Bestimmung der Verzweigungen im Ocellusbecher. L = L-Neuron, R = Rezeptorzellschicht.
d: Schnitt im Oberschlundganglion senkrecht zum ocellären Trakt. Neben dem angefärbten L-Neuron (Pfeil) erkennt man die Axone der restlichen, ungefärbten Neurone.

bestimmt. Bei bekannter Länge und bekanntem Durchmesser eines Axons lassen sich daraus die elektrotonische Länge L und die Längskonstante λ (aus Gl.4), sowie der Membranwiderstand R_m (aus Gl.6) errechnen. Daraus folgen wiederum aus Gl.5 und Gl.3 der Innenwiderstand R_i und die Membrankapazität C_m.

L-Neurone eignen sich ausgezeichnet zu einer derartigen Bestimmung der passiven Membraneigenschaften, da ihre Form stark dem zylindrischen Neuronmodell gleicht (Abb.14). Die im Verhältnis zum Gesamtneuron relativ geringen Verzweigungen können dem zylindrischen Modell gleichgesetzt werden (Rall 1969, 1977).

Eine wichtige Voraussetzung dieser Methode zur Bestimmung passiver Membraneigenschaften besteht darin, daß keine aktiven Membranprozesse die Messung beeinflußen. Solche Prozesse lassen sich aus Nichtlinearitäten von Strom-Spannungskennlinien folgern, wie sie auch bei L-Neuronen existieren (s.3.2.4). Um derartige Komplikationen zu vermeiden, wurden die Zeitkonstanten der L-Neurone nur bei kleinen (<15 mV) Spannungssprüngen in hyperpolarisierender Richtung bestimmt. In diesem Bereich ist die Kennlinie bei allen untersuchten Zellen linear. Eine weitere Kontrollmöglichkeit besteht in der Bestimmung der Zeitkonstanten bei verschieden starken Stromimpulsen, die aber noch im linearen Bereich der Kennlinie liegen. Da sich dabei immer die gleichen Werte ergeben, kann davon ausgegangen werden, daß sich in diesem Bereich keine aktiven Membranprozesse abspielen. Aus der Linearität der Kennlinie für kurze

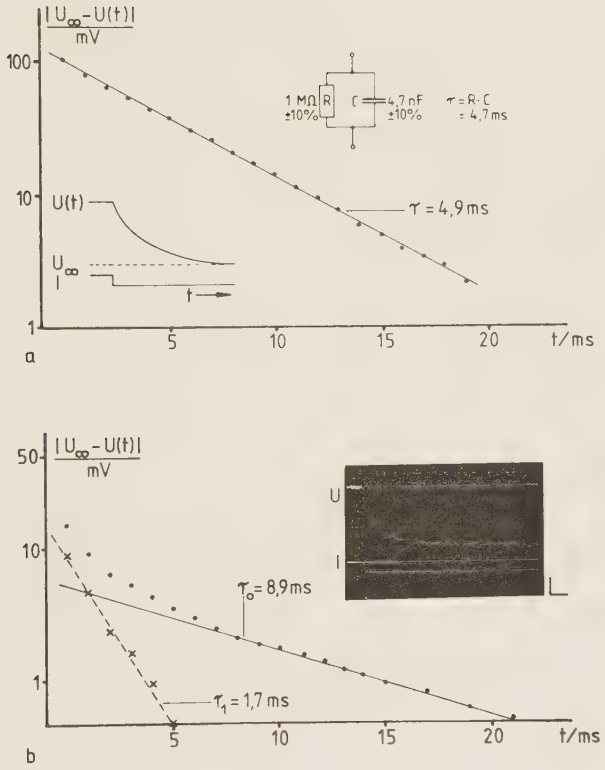


Abb.15. Zeitkonstantenbestimmung durch halblogarithmisches Auftragen der Membranspannung gegen die Zeit.
a: Testschaltung mit RC-Glied. Die aus der Geraden bestimmte Zeitkonstante stimmt sehr gut mit dem theoretischen Wert überein.
inset a: Werte der Testschaltung und schematische Darstellung der Spannungsmessung.
b: Zeitkonstantenbestimmung aus dem Spannungsabfall an der Membran eines L-Neurons (inset b). Die aus den Geraden errechneten Werte für τ_0 und τ_1 sind im Diagramm angegeben.
Kalibrierung: 5 mV, 5 ms.

Zeiten, bis weit in den negativen Spannungsbereich, erhält man einen zusätzlichen Sicherheitsfaktor, da sich die Zeitkonstantenmessungen in einem Zeitbereich von 0-30 ms bewegen (s.Abb.13c und Abb.15).
Zur Kontrolle der Ableitapparatur wurde der Spannungsabfall an einer Testschaltung halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Abb.15a zeigt, daß die gemessene Zeitkonstante im Rahmen der Fehler von Widerstand und Kondensator sehr gut mit dem theoretischen Wert übereinstimmt.
In Abb.15b sind die gemessenen Werte eines Neurons mit Ableitbeispiel dargestellt. Aus der Steigung der Regressionsgerade durch die Meßwerte bei späteren Zeiten kann τ_0 bestimmt werden. Die Differenz dieser Geraden mit den Meßpunkten bei früheren Zeiten ergibt wieder eine Gerade, deren Steigung die erste "ausgleichende" Zeitkonstante τ_1 ergibt (s. Rall 1969).
Zur Bestimmung der morphologischen Daten der L-Neurone wurden die Länge und der Durchmesser der Lucifer-Yellow-injizierten Zellen in vitro gemessen, so daß keine Verfälschung durch Fixierungsartefakte vorliegt. Teilweise hergestellte Schnitte dienten zusätzlich zum Ausmessen der Verzweigungen (Abb.14). Dabei zeigte sich, daß deren Länge und Oberfläche im Vergleich zur Gesamtlänge und Oberfläche des Axons vernachlässigbar sind, so daß für die weiteren Berechnungen nur die Daten des Axons verwendet wurden.

Parameter	Symbol	Einheit	L-Neurone	Literaturwerte aus Rall (1977) Tintenfisch	Krebs	Regenwurm
Eingangswiderstand....	R_n	Ω	(1,6 ±o,7)•1o^6 (n=39)	5•1o^3	1,5•1o^6	4,6•1o^5
Axondurchmesser.....	d	µm	26 ±6 (n=2o)	5oo	3o	1o5
Länge des Axons.....	x	cm	o,215 ±o,1o2 (n=1o)	-	-	-
Membranzeitkonstante..	$\tau_m (=\tau_o)$	ms	6,9 ±3,1 (n=39)	1	7	3,6
elektrotonische Länge.	L	-	1,35 ±o,25 (n=22)	-	-	-
spezifischer Membranwiderstand.....	R_m	Ω•cm^2	2,7•1o^3	1•1o^3	7•1o^3	12•1o^3
spezifischer Innenwiderstand.....	R_i	Ω•cm	68	3o	9o	2oo
Membrankapazität.....	C_m	µF/cm	2,6	1	1	o,3
Längskonstante.....	λ	cm	o,16	o,65	o,23	o,4

Tab.3. Parameter der passiven Membran der L-Neurone im Vergleich mit anderen Invertebratenaxonen. Bei den direkt gemessenen Werten ist die Standardabweichung angegeben. Der Axondurchmesser wurde pro Axon zweimal bestimmt. Zur Berechnung von R_m nach Gl.6 wurde für die Oberfläche des Neurons (A_o in Gl.6) die Oberfläche des Somas berücksichtigt. Der Durchmesser des Somas wurde dabei mit 4o um angesetzt.

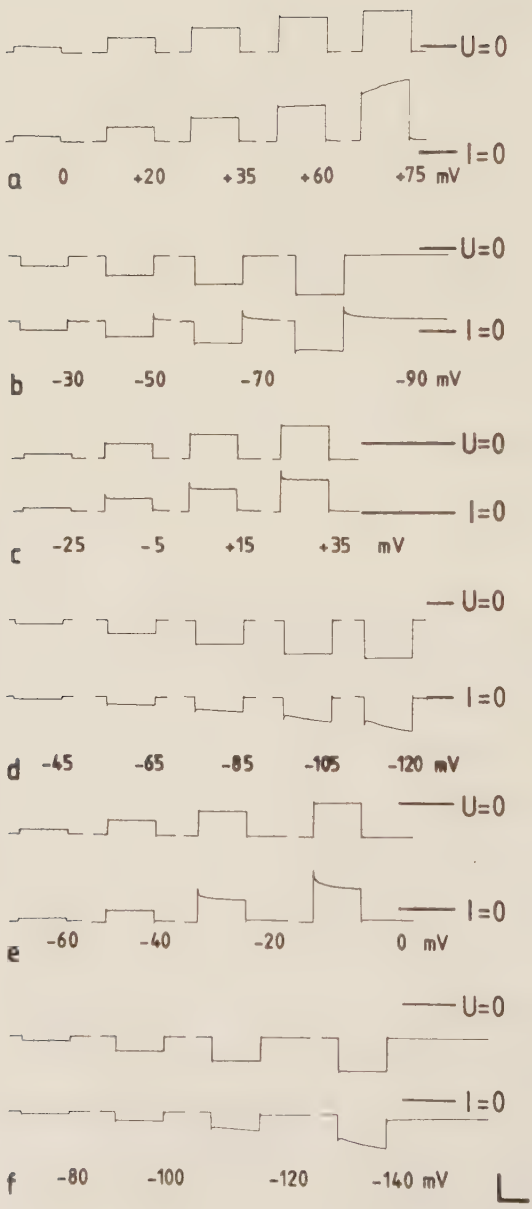
In Tab.3 sind die aus den Messungen errechneten Mittelwerte der elektrotonischen Länge L, des Eingangswiderstandes R_n, des Durchmessers d und der Länge x der L-Neurone, sowie die daraus bestimmten Parameter der passiven Membran eingetragen. Zum Vergleich dienen Literaturwerte aus Rall (1977), die an verschiedenen Invertebratenaxonen gewonnen wurden. Die Werte für die L-Neurone unterscheiden sich dabei nicht auffällig von denen der anderen Nervenzellen.

3.3 Voltage-Clamp Experimente

Mit der Methode des Voltage-Clamp lassen sich, im Gegensatz zum Current-Clamp, die durch Leitfähigkeitsänderungen verursachten Ionenströme genau bestimmen. Da sich im Current-Clamp parallel zur Leitfähigkeit auch der kapazitive Membranstrom und die elektromotorische Kraft ändern, können die einzelnen Komponenten nicht separat gemessen werden.
Der durch eine bestimmte Ionensorte verursachte Membranstrom hängt nämlich folgendermaßen von den anderen Parametern ab (Smith et al. 1980):

$$I_i = G_i(U_m - E_i) + C_m \frac{\delta U_m}{\delta t} \qquad (G1.7)$$

Dabei bedeutet I_i den durch die Ionensorte i verursachten Strom, G_i die Membranleitfähigkeit für dieses Ion, U_m die Membranspannung, E_i das Gleichgewichtspotential für das Ion i und C_m die Membrankapazität.
$C_m \frac{\delta U_m}{\delta t} = I_{cap}$ stellt dabei den kapazitiven Membranstrom und $(U_m - E_i)$ die elektromotorische Kraft dar. Um G_i bestimmen zu können, muß die elektromotorische Kraft konstant gehalten werden und der kapazitive Strom muß verschwinden.
Dies geschieht im Voltage-Clamp durch sehr schnelles Umladen der Membran während der Potentialsprünge und durch das Konstanthalten der Membranspannung während der übrigen Zeit. Weitergehende Probleme sind in den grundlegenden Arbeiten von Cole (1949), Moore und Cole (1963), Hodgkin und Huxley (1952) und Smith et al. (1980) erörtert.



Legende siehe rechts.

3.3.1 Ströme in Normalringer

Um eine Übersicht über die in den L-Neuronen vorhandenen, spannungsabhängigen Leitfähigkeiten zu bekommen, wurde eine Reihe von Voltage-Clamp Experimenten in Normalringer durchgeführt.
Abb.16 stellt ein gekürztes Schreiberprotokoll eines derartigen Versuchs dar. Bei verschiedenen Haltepotentialen werden der Membran positive und negative Kommandoimpulse steigender Amplitude aufgeprägt und die resultierenden Membranströme registriert. Diese entsprechen den sich ändernden Membranleitfähigkeiten. Übereinkunftsgemäß werden dabei in Voltage-Clamp Versuchen Ströme in negativer Richtung als Einwärtsströme und solche in positiver Richtung als Auswärtsströme definiert.
In Abb.16 sind wegen des schlechteren zeitlichen Auflösungsvermögens des Schreibers nur die langsamen Membranströme quantitativ dargestellt. Die schnellen Zacken am Anfang und Ende vieler Stromregistrierungen sind Überlagerungen des kapazitiven Ladestroms und schneller Ionenströme, die vom Schreiber nicht getrennt werden können. Diese werden später genauer dargestellt.
Bei einem Haltepotential von -1o mV zeigen sich während

Abb.16. Voltage-Clamp Versuch an einem L-Neuron in Normalringer.
Jeweils obere Spur: Spannung
Jeweils untere Spur: Strom
Die Balken rechts geben die Spannungs- (U = O) bzw. Stromnullniveaus (I = O) an.
a und b: Depolarisierende (a) und hyperpolarisierende (b) Spannungssprünge auf die jeweils unten angezeigten Niveaus. Haltepotential = -1o mV.
c und d: Wie a und b, Haltepotential -35 mV.
e und f: Wie a und b, Haltepotential -75 mV.
Kalibrierung: 5o mV, 5o nA, 4oo ms.

des Impulses sowohl bei positiven als auch bei negativen Sprüngen nur die entsprechenden Leckströme, die dem Ohmschen Gesetz gehorchen (Abb.16a und b). Erst bei starken Depolarisationen, über den physiologischen Bereich hinaus, entwickelt sich zusätzlich ein langsamer Auswärtsstrom. Anders reagiert das Neuron nach dem Ende hyperpolarisierender Spannungssprünge. Dort entwickelt sich mit zunehmenden negativen Potentialen sukzessiv ein schneller Auswärtsstrom, der nach einigen hundert Millisekunden wieder inaktiviert.(Abb.16b). Wie schon erwähnt, muß beachtet werden, daß die schnelle Spitze dieses Stromes nicht exakt wiedergegeben wird.

Bei einem Haltepotential von -35 mV, das dem Ruhepotential dieses L-Neurons entspricht, zeigt die Registrierung ein etwas komplizierteres Bild (Abb.16c und d). Kleine depolarisierende Sprünge induzieren einen schwachen, langsamen Auswärtsstrom, der am Beispiel des Neurons in Abb.16 schlecht zu erkennen ist, bei anderen Zellen jedoch stärker ausgeprägt sein kann (s.Abb.3o). Bei stärkeren Sprüngen wird dieser langsame Strom von einem schnellen Auswärtsstrom überlagert. Am Ende der positiven Impulse erkennt man einen Auswärts-Nachstrom, der die Inaktivierung erregter Kanäle widerspiegelt.

Spannungssprünge in negative Richtung verursachen einen starken langsamen Einwärtsstrom, der der anormalen Gleichrichtung der Current-Clamp Experimente entspricht (Abb.16d).

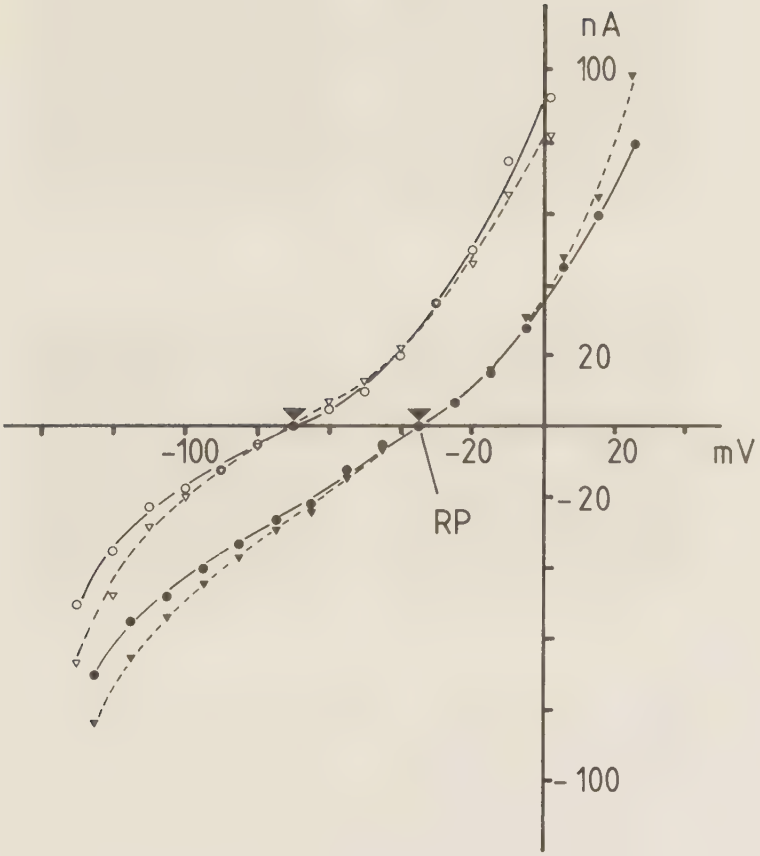


Abb.17. Strom-Spannungs Kennlinien aus einem Voltage-Clamp Experiment an einer Zelle in Normalringer
Die Ströme wurden jeweils nach 8o ms (●,o) und nach 5oo ms (▼,▽) gemessen. Die Spannungsimpulse erfolgten von den Haltepotentialen -35 mV und -7o mV (Pfeile). RP = Ruhepotential dieses L-Neurons. Die Kurven wurden von Hand den Meßpunkten angepaßt. Bei dieser Zelle entwickelt sich bei stärkeren positiven Spannungssprüngen von -35 mV aus ein deutlicher langsamer Auswärtsstrom (▼ im Vergleich zu ●).

Bei einem Haltepotential von -75 mV verstärkt sich der schnelle Auswärtsstrom in den positiven Impulsen beträchtlich (Abb.16e). Die negativen Spannungssprünge in Abb.16f verursachen wiederum wie bei -35mV einen starken Einwärtsstrom, der am Ende der Impulse noch keinen Gleichgewichtszustand erreicht hat. Zusätzlich treten noch sehr lange, einwärts gerichtete Nachströme auf.
In der Strom-Spannungs Kennlinie der Abb.17 sind die langsamen Ströme bei Impulsen ausgehend von zwei verschiedenen Haltepotentialen aufgetragen. Um die Zeitabhängigkeit darzustellen, wurden die Ströme jeweils bei zwei verschiedenen Zeiten gemessen. Es handelt sich dabei um eine andere Zelle als in Abb.16, bei der der langsame Auswärtsstrom bei positiven Impulsen vom Haltepotential von -35 mV stärker ausgeprägt ist. Die Kennlinien sind ausgesprochen nichtlinear, vor allem beim Haltepotential von -7o mV. Der langsame Einwärtsstrom bei negativen Impulsen von -35 mV aus beginnt sich bei -7o mV abzuzeichnen.

In Abb.18 sind die schnellen Ströme einer weiteren Zelle in sehr viel besserer zeitlicher Auflösung auf dem Oszillographenschirm dargestellt. Beim Haltepotential von -5o mV erkennt man nach dem Einsetzen der positiven Spannungsimpulse einen schnellen Auswärtsstrom, der innerhalb von 2-5 m.s ein Maximum erreicht und danach zumindest zum Teil wieder inaktiviert (Abb.18a). Bei einem Haltepotential von -8o mV geht diesem Auswärtsstrom, der bei diesem Potential stärker ausgeprägt ist, ein sehr schneller Einwärtsstrom

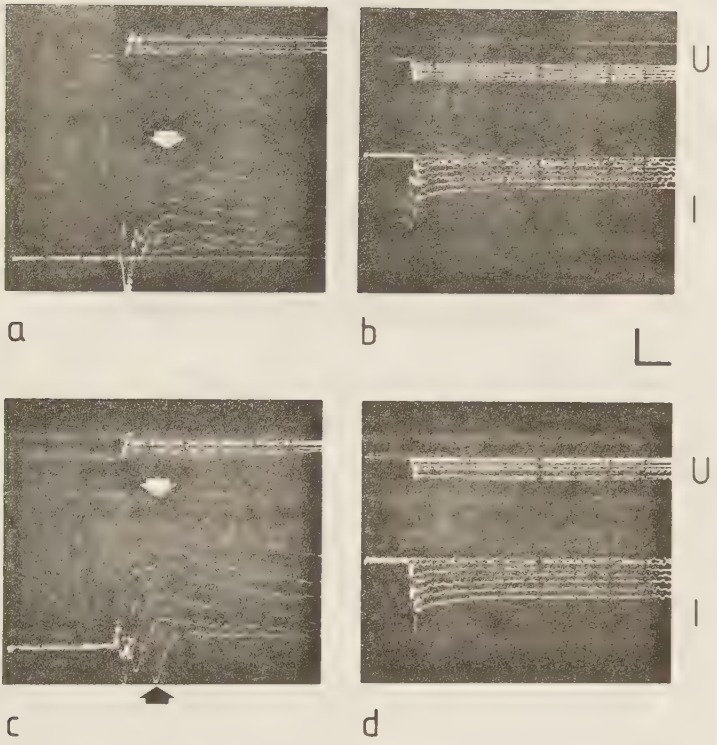


Abb.18. Schnelle Membranströme an einer Zelle in Normalringer. Es sind jeweils mehrere Oszillographenüberläufe überlagert. U = Spannungsregistrierung, I = Stromregistrierung. Das Nullniveau der Stromspur ist in b und d gegenüber a und c verschoben worden. Die durchgehenden Linien in a und b kennzeichnen das Nullpotential bzw. den Nullstrom. Das Spannungsrauschen der L-Neurone , das im Voltage-Clamp geklemmt wird, verursacht das starke Rauschen der Stromspur.Dies kann nicht völlig weggefiltert werden, da sonst die schnellen Ströme verfälscht werden. Die schnellen Zacken (<1 ms) am Anfang jeder Stromsprungregistrierung sind Anteile des kapazitiven Ladestroms. Die volle Amplitude wird dabei vom Speicheroszillographen nicht dargestellt, da der Aufstrich zu schnell erfolgt. Aufgrund der hohen Verstärkung zeigen die Strom- und Spannungsspuren bei jedem Sprung ein leichtes Einschwingen (<1 ms).
a und b: Haltepotential -5o mV. Positive (a) und negative (b) Spannungssprünge mit jeweils 1o mV zunehmender Amplitude. Pfeil in a: Maximum des schnellen Auswärtsstromes.
c und d: Haltepotential -8o mV. Weißer Pfeil: Maximum des schnellen Auswärtsstromes. Schwarzer Pfeil: Maximum des schnellen Einwärtsstromes, der in dieser Registrierung nur für die beiden kleinsten Impulse vom kapazitiven Ladestrom getrennt werden kann.
Kalibrierung: a und c. 1oo mV, 5o nA, 2 ms.
b und d. 1oo mV, 5o nA, 5 ms.

voraus. Im allgemeinen kann dieser Strom von der Voltage-Clamp Anordnung nur bei kleineren Impulsen genauer erfaßt werden, da er bei höheren Impulsen vom kapazitiven Ladestrom überlagert wird (Abb.18c). Dieser Einwärtsstrom ist offensichtlich die Ursache der "Aktionspotentiale" im Current-Clamp (s. 3.2.3).
Die negativen Ströme auf hyperpolarisierende Spannungsimpulse gehorchen im dargestellten Zeitbereich dem Ohmschen Gesetz und spiegeln die momentane Leitfähigkeit der L-Neurone wider (Smith et al. 198o). Diese ist beim Haltepotential von -5o mV kleiner als bei -8o mV, da bei diesem Potential die anormale Gleichrichtung bereits wirksam ist (s. 3.3.1).

Die Voltage-Clamp Versuche in Normalringer erhärten die Ergebnisse der Current-Clamp Experimente, die bereits stark auf spannungsabhängige Leitfähigkeiten hinwiesen. Auch hier kann zwischen "schnellen" (<1o ms) und "langsamen"(>1o ms) Vorgängen unterschieden werden.
Da über diese Leitfähigkeitsänderungen in L-Neuronen nichts bekannt ist, muß als erstes versucht werden, die einzelnen Anteile zu separieren. Dies kann einmal durch das sehr unterschiedliche Zeitverhalten erreicht werden, da die schnellen von den langsamen Strömen nicht beeinflußt werden.
Deshalb werden in der weiteren Darstellung die beiden Gruppen getrennt dargestellt. Dies geschieht auch aus Gründen der besseren Interpretationsmöglichkeit der schnellen Ströme.
Um in den beiden Gruppen die einzelnen Ströme zu trennen, ist die Anwendung von Pharmaka notwendig, die einzelne

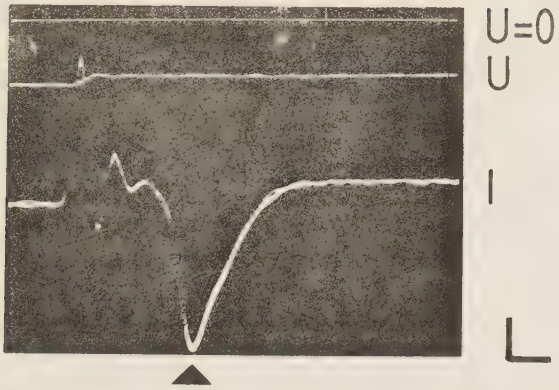


Abb.19. Schneller Einwärtsstrom in 4-Aminopyridin-Ringer (▲). Überlagerung von vier Oszillographenüberläufen. Haltepotential = -75 mV. Der Spannungssprung erfolgt auf -65 mV. Die hohe Verstärkung der Voltage-Clamp Apparatur verursacht am Anfang des Impulses ein leichtes Überschwingen des kapazitiven Stromes. Kalibrierung: 5o mV, 2o nA, 1 ms.

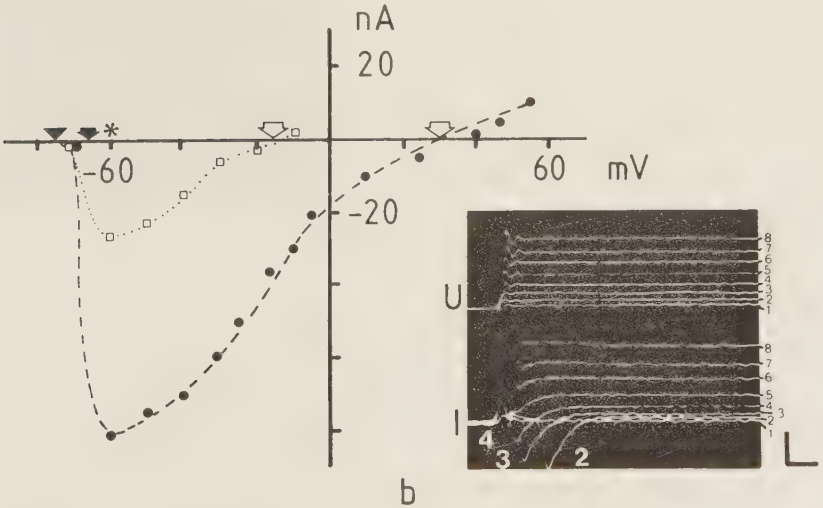


Abb.2o. a: Strom-Spannungs Kennlinie des schnellen Einwärtsstromes zweier verschiedener Zellen in Normalringer (□) bzw. in 4-Aminopyridin-Ringer (●). ▼ = Haltepotential beider Neurone (-75 mV), ⬇ = Schwelle des Einwärtsstromes, * = Maximum des Einwärtsstromes, ⇩ = Umkehrpotentiale. Der Leckstrom, der aus hyperpolarisierenden Impulsen kleiner Amplitude bestimmt wurde, ist in beide Kurven subtrahiert worden, um den Nettostrom zu erhalten.
b: Versuchsprotokoll zur Bestimmung der Kennlinie. 4-Aminopyridinringer. Zahlen: Zugehörige Überläufe. Haltepotential = -75 mV. Der erste Impuls auf -7o mV erregt noch keinen Einwärtsstrom.
Kalibrierung: 5o mV, 5o nA, 2 ms.

Ionenkanäle blockieren können. Derart separierte Ströme können anschließend durch ihre Strom-Spannungs Kennlinie und ihr Inaktivierungsverhalten näher charakterisiert werden.

3.3.2 Charakterisierung des schnellen Einwärtsstromes

Da die Voltage-Clamp Anordnung im Präparat nur in wenigen Fällen eine Zeitkonstante <2 ms erreichte, konnte der schnelle Einwärtsstrom nur in vier L-Neuronen genauer untersucht werden. Um Komplikationen zu vermeiden, die durch die Überlagerung mit dem schnellen Auswärtsstrom entstehen, wurde teilweise 4-Aminopyridin-Ringer verwendet. Dadurch wird der schnelle Auswärtsstrom gehemmt (s. 3.3.3).
In Abb.19 ist der schnelle Einwärtsstrom in 4-Aminopyridin-Ringer dargestellt. Das Haltepotential beträgt dabei -75 mV und der Spannungssprung erfolgt auf -65 mV.
Durch steigende positive Sprünge von diesem negativen Haltepotential aus kann die Kennlinie des schnellen Einwärtsstromes aufgestellt werden (Abb.2o). Die Schwelle des Einwärtstromes liegt bei etwa -65 mV, d.h. beim selben Wert wie die Schwelle der "Aktionspotentiale" in den Current-Clamp Versuchen (Abb.2oa). Das Maximum des Einwärtsstromes tritt bei -6o mV auf, und die Umkehr erfolgt zwischen +3o und +4o mV. In diesen Versuchen wurde der Serienwiderstand nicht kompensiert, um die Clamp-Anordnung schneller zu machen. Dies hat einen gewissen Effekt auf die genaue Spannungsmessung, der

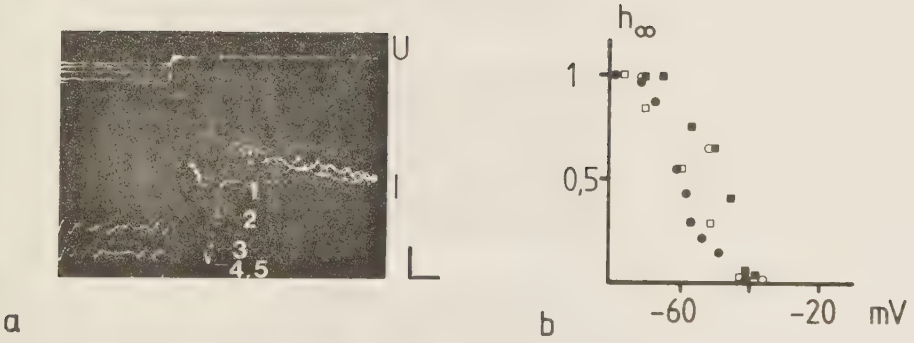


Abb.21. Steady-State Inaktivierung des schnellen Einwärtsstromes in Normalringer.
a: Spannungssprünge von negativen Haltepotentialen auf -35 mV aktivieren den schnellen Einwärtsstrom unterschiedlich stark. 1 - 5 = die von den Haltepotentialen von -45 (1), -55 (2), -65 (3), -8o (4) und -85 mV (5) erregten Einwärtsströme. Nur die zu den Haltepotentialen von -45 mV und -55 mV gehörenden Haltesträme sind in der Abb. sichtbar.
Kalibrierung: 5o mV, 1o nA, 2 ms.
b: Inaktivierungskurven von vier verschiedenen Neuronen, aufgestellt aus Versuchen wie in a. Aufgetragen ist jeweils das Verhältnis des Maximalstromes zum Strom beim jeweiligen Haltepotential (h_∞) gegen das Haltepotential.

in der Diskussion berücksichtigt werden muß (s. 4.5). Die zweite Kurve in Abb.2oa zeigt die Ergebnisse eines entsprechenden Versuches, wobei sich die Zelle jedoch in Normalringer befand. In diesem Fall, in dem der schnelle Einwärtsstrom durch den schnellen Auswärtsstrom zum Teil überlagert wird, liegen die Schwelle und die Maximalamplitude des Einwärtsstromes zwar bei den gleichen Potentialen, das Umkehrpotential ist jedoch nach -15 mV verschoben.
Dies erklärt zumindest qualitativ die geringe Amplitude der "Aktionspotentiale" in L-Neuronen. Der dem Einwärtsstrom folgende Auswärtsstrom ist so schnell, daß der Repolarisationsprozess des "Aktionspotentials" einsetzt, bevor die Einwärtsleitfähigkeit ihr Maximum erreicht. Dadurch kann das Membranpotential nicht sehr weit in Richtung des Gleichgewichtspotentials des schnellen Einwärtsstromes folgen.

Durch Potentialsprünge von verschiedenen negativen Niveaus auf ein konstantes Potential über der Schwelle läßt sich die Inaktivierungskurve des schnellen Einwärtsstromes bestimmen. Nach dem Hodgkin-Huxley-Modell der Inaktivierung des Natriumstromes wurde die Inaktivierungskonstante h_∞ dargestellt, die sich aus dem Verhältnis des Maximalstromes zum Strom beim eingestellten Potential ergibt. Abb.21a zeigt die Methode der Bestimmung der Inaktivierungskurve und in Abb.21b sind die Werte für vier verschiedene Neurone dargestellt. Der 5o%-Wert der Inaktivierung liegt dabei zwischen -6o mV und -45 mV.

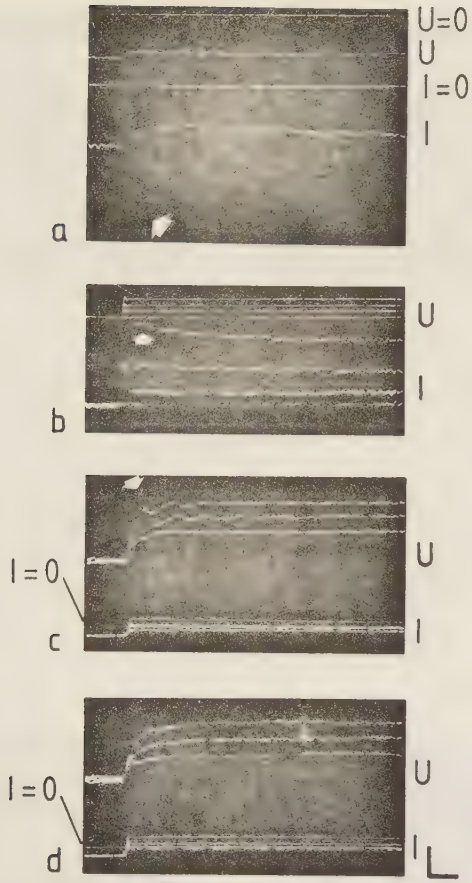


Abb.22. Einfluß von Tetrodotoxin auf den schnellen Einwärtsstrom im Voltage-Clamp (a und b) bzw. auf das "Aktionspotential" im Current-Clamp (c und d).
a: Normalringer. Haltepotential = -7o mV. Ein Potentialsprung auf -6o mV aktiviert den schnellen Einwärtsstrom (Pfeil).
b: Tetrodotoxin-Ringer. Haltepotential = -7o mV. 1o-3o mV Sprünge in positiver Richtung können keinen Einwärtsstrom mehr aktivieren. Der schnelle Auswärtsstrom ist noch vorhanden (Pfeil).
c: Current-Clamp in Normalringer. Haltestrom = -2o nA. Zellpotential = -85 mV. Positive Stromimpulse erzeugen "Aktionspotentiale" (Pfeil).
d: Wie c, Tetrodotoxin-Ringer. Stromimpulse gleicher Stärke können keine "Aktionspotentiale" mehr hervorrufen.
a und b, sowie c und d jeweils vom gleichen Neuron.
Kalibrierung: a, b. 5o mV, 2o nA, 5 ms.
c, d. 2o mV, 5o nA, 5 ms.

Daraus läßt sich mit Sicherheit ableiten, daß beim normalen Ruhepotential der L-Neurone die schnellen Einwärtskanäle zum größten Teil - wenn nicht sogar vollständig - inaktiviert sind, womit sich die Vermutung der Current-Clamp Experimente bestätigt.

Die Summe dieser Daten und das Zeitverhalten sowohl des "Aktionspotentials" als auch des entsprechenden Einwärtsstromes legen den Verdacht auf eine spannungsabhängige Natriumleitfähigkeit nahe. Andere Möglichkeiten wären eine schnelle Kalzium- oder eine gemischte Kalzium-Natrium-Leitfähigkeit, wie dies bei anderen Nervenzellen beschrieben wurde (Adams et al. 1980, Hagiwara 1973, Hagiwara & Byerly 1981, Kostyuk 1980).
Versuche, analog dem in Abb.22 zeigen, daß sich die schnellen Einwärtsströme und die "Aktionspotentiale" in L-Neuronen durch Tetrodotoxin in µ-molarer Konzentration hemmen lassen. Da Tetrodotoxin sehr spezifisch Natriumkanäle blockiert und auf andere Kanäle keinen Einfluß ausübt, wird dies allgemein als hinreichender Beweis für spannungssensitive Natriumkanäle angesehen (Narahashi 1974). Versuche mit verschiedenen Natriumkonzentrationen wurden nicht durchgeführt, da die L-Neurone noch vom Perineurium mit den darin enthaltenen Gliazellen umgeben sind. Diese regeln offensichtlich auch die extrazelluläre Ionenkonzentration, so daß diese in einem Versuch nicht gezielt verändert werden könnte (Pichon & Boistel 1967, Treherne 1972, Treherne & Schofield 1981).

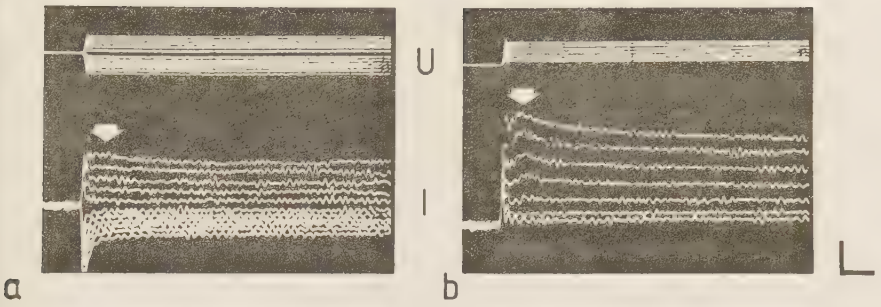


Abb.23. Aktivierbarkeit des schnellen Auswärtsstromes bei zwei verschiedenen Haltepotentialen in Tetrodotoxin.
a: Haltepotential -4o mV. Fünf positive und negative Impulse mit jeweils 1o mV Amplitudenzunahme. Bei diesem Haltepotential kann der schnelle Auswärtsstrom nur schwach erregt werden. Der Vergleich zwischen positiven und negativen Strömen macht den Gleichrichteffekt deutlich sichtbar.
b: Haltepotential -7o mV. Sieben positive Spannungssprünge mit jeweils 1o mV Amplitudenzunahme.
Pfeile in a und b: Maxima des schnellen Auswärtsstroms bei positiven Impulsen. Kalibrierung: 1oo mV, 2o nA, 5 ms.

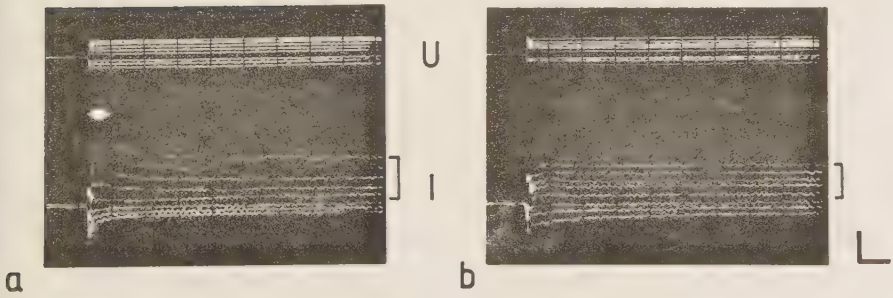


Abb.24. Einfluß von 4-Aminopyridin auf den schnellen Auswärtsstrom in Tetrodotoxin-Ringer.
a: Haltepotential -65 mV. Positive und negative Impulse, jeweils 1o mV zunehmend. Pfeil: Maxima der schnellen Auswärtsströme.
b: Ströme in Tetrodotoxin-Ringer mit 4-Aminopyridin. Gleiche Spannungssprünge wie in a.
Klammer in a und b: Ströme nach 45 ms bei einem positiven Spannungssprung von -65 mV auf -15 mV.
Kalibrierung: 1oo mV, 5o nA, 5 ms.

3.3.3 Charakterisierung des schnellen Auswärtsstromes

Da in Tetrodotoxin-Ringer der schnelle Einwärtsstrom blockiert wird, der schnelle Auswärtsstrom jedoch erhalten bleibt, konnte auch dieser quantitativ charakterisiert werden (s. Abb.22b).
Das Experiment in Abb.23 zeigt die Aktivierbarkeit des schnellen Auswärtsstromes eines L-Neurons in Tetrodotoxin-Ringer bei zwei verschiedenen Haltepotentialen. Diese ist bei einem Haltepotential von -7o mV größer als beim Haltepotential von -4o mV. In Abb.23a wird außerdem der schnelle Gleichrichteffekt bei positiven Impulsen deutlich. Für depolarisierende Spannungssprünge sind höhere Stromstärken erforderlich, als für hyperpolarisierende Sprünge. Diese Gleichrichtung erfolgt so schnell, daß in Abb.23a der Zeitverlauf nicht erkennbar ist. Sie entspricht damit dem Gleichrichteffekt der Current-Clamp Versuche bei positiven Stromimpulsen.
Da keine Chloridleitfähigkeit bekannt ist, die bei positiven Impulsen erregt wird, lag der Verdacht auf einen schnellen Kaliumstrom nahe. Anhand der Ionenverteilung in Nervenzellen kommt nur noch dieses Ion für einen Auswärtsstrom in Frage. Die bekannten Ströme dieser Art können vor allem mit 4-Aminopyridin blockiert werden (Pelhate & Pichon 1974, Pichon 1981, Thompson 1982). In Abb.24 ist das Ergebnis eines Versuchs in 4-Aminopyridin-Ringer dragestellt.
Bei einem Haltepotential, bei dem in Tetrodotoxin-Ringer der schnelle Auswärtsstrom stark aktivierbar ist, kann er durch

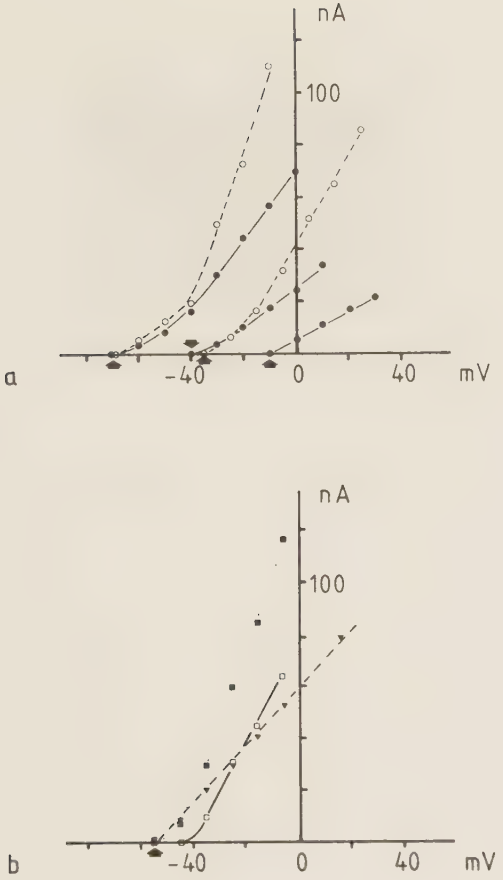


Abb.25. a: Strom-Spannungs Diagramm des gesamten Auswärtsstromes zweier verschiedener Zellen (● und ○) in Tetrodotoxin-Ringer. Es ist jeweils das Maximum des Stromes gegen die Amplitude des Spannungssprunges vom jeweiligen Haltepotential aufgetragen. ○ = positive Sprünge von den Haltepotentialen -7o mV und -35 mV. ● = pos. Sprünge von -7o mV, -4o mV und -1o mV. Die Pfeile markieren die Haltepotentiale der beiden Zellen.
b: Ströme in Tetrodotoxin-Ringer, vor (■) und nach (▼) Zugabe von 4-Aminopyridin, gemessen jeweils 3 ms nach Impulsanfang. (▼) gibt dabei den Leckstrom nach 4-Aminopyridinzugabe an. Die Differenz der beiden Ströme (□) ergibt den Nettoauswärtsstrom. (▲) = Haltepotential.
Sämtliche Kurven sind von Hand den Meßwerten angepaßt.

zusätzliches 4-Aminopyridin praktisch völlig blockiert werden. Die negativen Ströme lassen erkennen, daß 4-Aminopyridin praktisch keinen Einfluß auf den momentanen Widerstand ausübt (Abb.24b). Die Ströme sind nun in positiver wie in negativer Richtung symmetrisch und gehorchen dem Ohmschen Gesetz. Ein Vergleich von Abb.24a mit Abb.24b ergibt außerdem, daß der schnelle Auswärtsstrom bei höheren positiven Impulsen im gezeigten Zeitbereich nicht vollständig inaktiviert, so daß die Zelle bei positiven Spannungen auch nach längerer Zeit noch gleichrichtend wirkt.

In Abb.25 sind die Ergebnisse dieser Versuche in Strom-Spannungs Diagrammen dargestellt. Abb.25a zeigt die Aktivierbarkeit zweier verschiedener Zellen bei zwei, bzw. drei verschiedenen Haltepotentialen. Man erkennt auch, daß die absolute Stärke des Auswärtsstromes von Neuron zu Neuron sehr verschieden sein kann. Die Abb.25b gibt die Ergebnisse eines Versuchs mit 4-Aminopyridin wie in Abb.24 wieder. Wenn man die Ströme nach der Blockierung der Kanäle durch 4-Aminopyridin von den Strömen in Tetrodotoxin-Ringer abzieht, erhält man die Strom-Spannungs Kennlinie des schnellen Auswärtsstromes. Diese ist in Abb.25b mit der durchgehenden Linie gekennzeichnet. Die Schwelle für den schnellen Auswärtsstrom liegt in diesem Beispiel bei -45 mV, also etwas unter dem Ruhepotential der L-Neurone. In den verschiedenen untersuchten Zellen schwankte sie zwischen -5o mV und -4o mV.

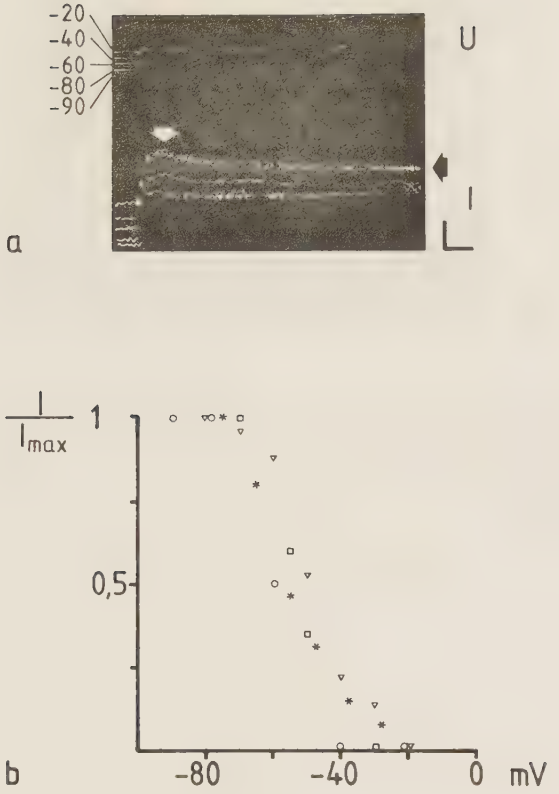


Abb.26. Bestimmung der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung des schnellen Auswärtsstromes.
a: Spannungssprünge von den links angegebenen Niveaus auf -1o mV und daraus resultierende Ströme (weißer Pfeil). Auch nach 45 ms ist noch ein beträchtlicher Auswärtsstrom erkennbar (schwarzer Pfeil). Die beiden oberen Stromspuren resultieren aus den Spannungssprüngen von -9o mV und -8o mV, die mittlere Spur aus dem Sprung von -6o mV und die unteren von -4o mV und -2o mV.
b: Steady-State Inaktivierung von vier verschiedenen Zellen in Tetrodotoxin-Ringer.
Kalibrierung: 1oo mV, 2o nA, 5 ms.

Die Inaktivierungskurve kann in Versuchen entsprechend denen der Natriuminaktivierung bestimmt werden. Abb.26a stellt die Aufzeichnung eines derartigen Versuchs dar und in Abb.26b sind die Ergebnisse von vier verschiedenen Zellen aufgetragen. Auch hier wurde das Verhältnis der bei einem bestimmten Potential gemessenen Ströme zum Maximalstrom bestimmt und gegen das Potential aufgetragen. Die Sprünge von den verschiedenen konditionierenden, negativen Potentialen erfolgten auf -1o mV. Wiederum wird in Abb.26a deutlich, daß der schnelle Auswärtsstrom zeitlich sehr langsam inaktiviert. Da bei längeren Zeiten Interferenzen mit den langsamen Strömen erwartet werden müssen, konnte diese zeitliche Abhängigkeit der Inaktivierung leider nicht bestimmt werden.
Die Spannungsabhängigkeit der Steady-State Inaktivierung, die sich aus Abb.26b ergibt, zeigt einen ähnlichen Verlauf wie diejenige des schnellen Einwärtsstromes. Das 5o%-Niveau liegt ebenfalls im Bereich um -55mV, lediglich die Steigung der Kurve ist etwas flacher, so daß auf dem normalen Ruhepotential der L-Neurone der schnelle Auswärtsstrom noch bis zu ca. 2o% aktiviert werden kann.

Mit Hilfe der Doppelimpulstechnik kann das Umkehrpotential des schnellen Auswärtsstromes bestimmt werden. Dabei erregt ein erster, positiver Kommandoimpuls von einem ausreichend negativen Haltepotential aus den schnellen Auswärtsstrom. In dessen Maximum folgt ein zweiter Kommandoimpuls auf ein wiederum negatives Potential. Der momentane

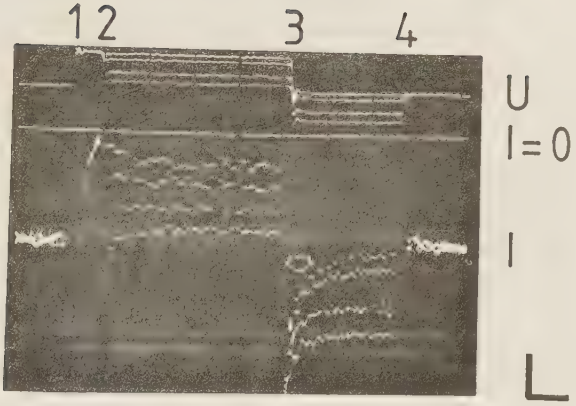


Abb.27. Umkehrpotential des schnellen Auswärtsstromes. Der erste Potentialsprung erfolgt von -9o mV auf -4o mV (1) und aktiviert den schnellen Auswärtsstrom. Nacheinander erfolgen im Maximum des Stromes Sprünge zurück auf -5o mV, -75 mV und -85 mV (2). Der momentane Strom kehrt sein Vorzeichen bei -75 mV um. Der Pfeil deutet die Nachströme bei jeweils 5o mV Sprüngen in negative Richtung von -4o mV, -5o mV, -75 mV und -85 mV an (3). Bei den Rücksprüngen auf -9o mV werden keine schnellen Ströme erregt (4).
Kalibrierung: 5o mV, 2o nA, 5 ms.

Strom kurz nach Einsetzen des zweiten Impulses gibt die momentane Leitfähigkeit bei der Spannung des ersten Impulses wieder. Nähert sich das Potential des zweiten Spannungssprunges dem Gleichgewichtspotential der beteiligten Ionenart, wird der Strom aufgrund der geringeren elektromotorischen Kraft kleiner. Beim Überschreiten des Gleichgewichtspotentials ändert er schließlich sein Vorzeichen.
In Abb.27 ist das Protokoll eines solchen Versuchs dargestellt. Der erste Spannungssprung erfolgt von -9o mV auf -4o mV, die jeweils zweiten Sprünge klemmen die Spannung wieder auf negativere Potentiale. Der momentane Strom nach Einsetzen des zweiten Impulses ändert sein Vorzeichen bei ca. -75 mV, also im Bereich des Kaliumgleichgewichtspotentials.
Ebenfalls interessant sind in diesem Zusammenhang die Nachströme, die in Abb.27 an der Stelle der Überlagerung der beiden Spannungsimpulse sichtbar werden. Sie spiegeln die Inaktivierung offener Kaliumkanäle wider, die durch die ersten beiden Spannungssprünge aktiviert wurden und beim dritten Sprung auf Potentiale $\leq$-9o mV sehr schnell wieder inaktivieren. Da die Spannungen dabei unter das Kaliumgleichgewichtspotential geklemmt werden, sind die entsprechenden momentanen Ströme einwärts gerichtet.
Deutlich wird schließlich noch, daß sich beim vierten Sprung, zurück auf -9o mV, kein schneller Strom erregen läßt.

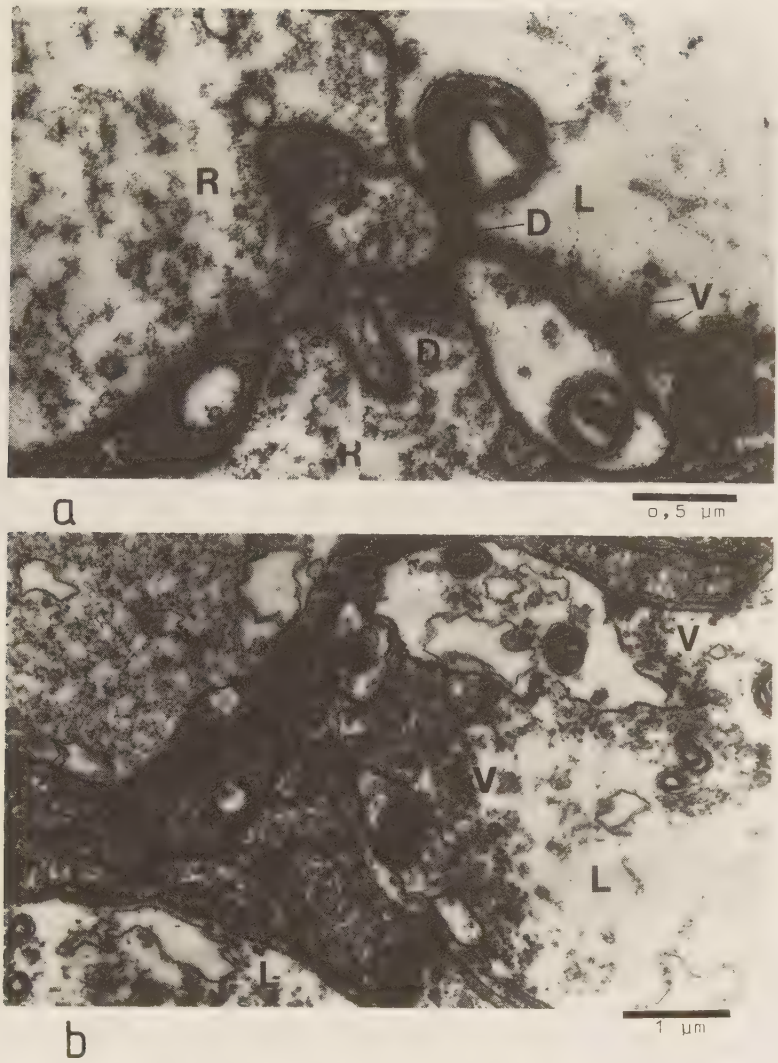


Abb.28. EM - Aufnahmen aus der plexiformen Schicht des Ocellusbechers (a) bzw. aus dem Ocellusnerv (b), in denen die intensive Verschaltung deutlich wird. In a sind zwei der typischen dyadischen Synapsen zu sehen (D). V = synaptische Vesikel, L = L-Neuron, R = höchstwahrscheinlich Rezeptorzellen. Die Herkunft der sonstigen Fortsätze ist unklar. Die EM - Bilder wurden von Frau Rambold hergestellt.

3.3.4 Langsame Ströme

Die Charakterisierung der langsamen Ströme, die in 3.3.1 phänomenologisch beschrieben wurden, gestaltet sich bedeutend schwieriger, als die der schnellen Ströme. Dies wird beim Betrachten der Abb.28 deutlicher. L-Neurone interagieren in der plexiformen Schicht des Ocellus, aber auch in bestimmten Bereichen des Nervs offensichtlich mit anderen Zellen des ocellären Traktes (L.J.Goodman et al. 1976, Toh & Hara 1984, Toh & Sagara 1984). In Abb.28 sind einige Synapsen im Ocellusbecher und im Nerv dargestellt.
Es besteht also durchaus die Möglichkeit, daß über Rückkopplungseffekte während Spannungssprüngen im Voltage-Clamp auch synaptische Leitfähigkeiten verändert werden.
Ein direkter Feedback, von den L-Neuronen auf die Rezeptoren, während der Lichtantwort wird zumindest bei den L-Neuronen des Libellenocellus diskutiert (Chappell & Dowling 1972, Klingman & Chappell 1978, Stone & Chappell 1981). Eine weitere Möglichkeit wäre die Übertragung der Potentialänderungen von den L-Neuronen auf andere Sekundärneurone und entweder eine direkte Rückkopplung von diesen wieder auf die L-Neurone oder auch indirekt über die Rezeptoren auf die L-Neurone. Von den synaptischen Gegebenheiten her wären alle drei Möglichkeiten vorstellbar.
Um die synaptischen Ströme während eines Lichtreizes zu messen, wurden Versuche analog dem von Abb.29 durchgeführt. Dabei wird zuerst die normale Lichtantwort des L-Neurons registriert, anschließend die Zelle im Voltage-Clamp auf

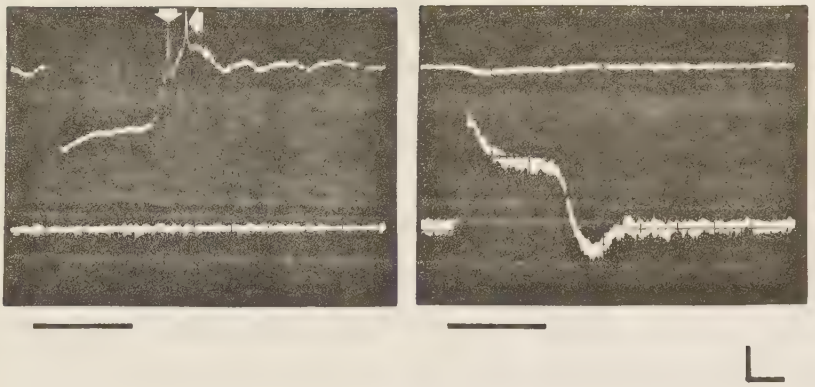


Abb.29. a: Lichtinduzierte Potentialänderung eines L-Neurons. Diese Zelle zeigt bei Lichtende zwei "fast off transients" (Pfeile).
b: Dasselbe Neuron, im Voltage-Clamp Modus auf Ruhepotential geklemmt, und mit einem Lichtreiz gleicher Intensität wie in a gereizt. Die Stromspur zeigt den zum Konstanthalten des Potentials erforderlichen Klemmstrom.
Balken: Dauer des Lichtreizes.
Kalibrierung: 1o mV, 1o nA, 5o ms.

Ruhepotential geklemmt und dann ein Lichtreiz gleicher Intensität gegeben. Der resultierende lichtinduzierte Klemmstrom entspricht der Summe der synaptischen Ströme dieses Neurons, das dabei unter keinen Umständen einen Feedback ausüben kann, da sein Potential konstant gehalten wird.

Wie zu erwarten, sind in der Stromspur von Abb.29 die dem "fast off transient" und der nachfolgenden schnellen Hyperpolarisation entsprechenden schnellen Ein- bzw. Auswärtsströme nicht vorhanden. Somit sind dies keine synaptischen Vorgänge. Dagegen sprechen zudem die Geschwindigkeiten der schnellen Leitfähigkeitsänderungen, sowie pharmakologische Ergebnisse (s. Abb.12 und 3.3.4.1).

Der Vergleich von Abb.29a und Abb.29b zeigt, daß sich die Zeitverläufe von Strom und Spannung zwar unterscheiden, die groben Komponenten der Lichtantwort, wie on-Spitze, Plateau und "slow off transient" im lichtinduzierten Klemmstrom aber ebenfalls vorhanden sind. Dies bedeutet, daß zumindest die grobe Form des Potentials bei einer lichtinduzierten Antwort synaptischen Ursprungs ist. Man kann sogar fordern, daß zumindest beim "slow off transient" noch andere Neurone als die Rezeptoren beteiligt sind, da sich diese Phase mit der Lichtantwort der Rezeptoren allein nicht erklären läßt (s.Abb.8a). Auch an einem direkten Feedback, wie er von Klingman & Chappell (1978) vorgeschlagen wird, müßten außer dem geklemmten Neuron noch andere beteiligt sein.

Andererseits sind derartige Versuche kein Beweis gegen langsame spannungssensitive Leitfähigkeiten. Aber sie weisen

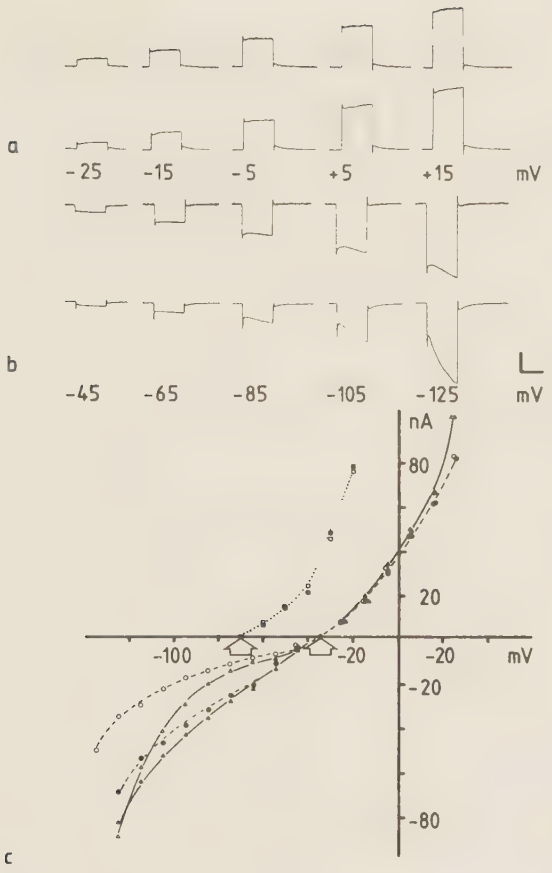


Abb.3o. Effekt von d-Tubocurarin auf die Ströme im Voltage-Clamp.
a: Klemmströme bei Potentialsprüngen vom Haltepotential -35 mV auf die angegebenen Werte. Positive Sprünge in Normalringer (obere Reihe) und Curare-Ringer (untere Reihe). Die Spannungssprünge sind der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.
b:Wie a, aber negative Sprünge auf die angegebenen Werte. Obere Reihe: Normalringer. Untere Reihe: Curare.
c: Strom-Spannungskennlinie des schnellen Auswärtsstromes und der langsamen Ströme in Normalringer (geschlossene Symbole) und in Curare-Ringer (offene Symbole). ●, ○ = Ströme, gemessen nach 8o ms. ▲, △ = Ströme, gemessen nach 5oo ms. ■, □ = Maxima der schnellen Auswärtsströme bei depolarisierenden Impulsen von -7o mV (gemessen von Oszillographenaufnahmen). Pfeile: Haltepotentiale. Die Kurven sind von Hand angepaßt.
Kalibrierung in a und b: 2o nA, 4oo ms.

darauf hin, daß synaptische Vorgänge in Voltage-Clamp Versuchen eine Rolle spielen. Um diese näher zu beleuchten, wurden verschiedene Experimente mit d-Tubocurarin (Curare) und $CoCl_2$ durchgeführt. Dabei sollte Curare zur Blockade der synaptischen Übertragung von den Rezeptoren auf die L-Neurone und $CoCl_2$ zur summarischen Blockade aller Synapsen dienen.

3.3.4.1 Beeinflußung der langsamen Ströme durch Curare und $CoCl_2$

Curare, das die lichtinduzierte Antwort der L-Neurone unterdrückt (Klingman & Chappell 1978), verändert in Voltage-Clamp Versuchen die langsamen Membranströme beträchtlich. Die größte Änderung findet dabei auf einem Haltepotential statt, das dem normalen Ruhepotential entspricht, wie dies in Abb.3o dargestellt ist. Während bei depolarisierenden Spannungssprüngen keine gravierenden Unterschiede zu den Strömen in Normalringer zu erkennen sind und auch der schnelle Auswärtsstrom bei positiven Sprüngen von negativen Haltepotentialen aus erhalten bleibt, zeigen sich jedoch starke Änderungen in hyperpolarisierender Richtung. Die anfängliche Leitfähigkeit des Neurons ist stark erniedrigt, während der zeit- und spannungsabhängige Gleichrichteffekt außerordentlich zunimmt. Die ganze Strom-Spannungs Kennlinie wird damit unter Curareeinfluß noch stärker nichtlinear (Abb.3ob,c). Unter der Annahme, daß Curare nicht selbst spannungs-

abhängige Kanäle beeinflußt, wofür es in der Literatur keine Hinweise gibt, bedeutet dies, daß langsame Leitfähigkeitsänderungen im Voltage-Clamp zumindest nicht durch synaptische Eingänge von seiten der Rezeptoren hervorgerufen werden.

Als zweite Möglichkeit könnten Feedbackeffekte über andere Sekundärneurone vorhanden sein, die die langsamen Ströme im Voltage-Clamp beeinflußen würden. Um dies zu untersuchen, wurden mehrere Experimente mit $CoCl_2$ und ein Versuch mit $CdCl_2$ durchgeführt, die dafür bekannt sind, die synaptische Übertragung zu hemmen (Narahashi 1974).

Leider ergaben sich dabei keine eindeutigen Ergebnisse. Weder $CdCl_2$ noch $CoCl_2$, die beide spannungsabhängige Kalziumströme und damit die Transmitterfreisetzung blockieren können, unterdrücken die lichtinduzierte Antwort der L-Neurone. Zwar erniedrigt sich die Empfindlichkeit, was auch von Wilson (1978c) berichtet wird, doch die synaptische Übertragung bleibt zum großen Teil erhalten. Daraus muß man folgern, daß auch eventuelle synaptische Einflüsse von anderen Neuronen nicht vollständig blockiert werden.

Beide Substanzen haben außerdem den Nachteil, daß sie nicht nur die Transmitterfreisetzung hemmen können, sondern auch spannungsabhängige Kalziumströme und damit auch Kalziumabhängige Kaliumströme. Dadurch können sich mehrere Effekte überlagern.

Abb.31 stellt die Kennlinie eines L-Neurons in $CoCl_2$-Ringer im Vergleich zu der in Normalringer dar. Dieses Neuron zeigte dabei den stärksten Effekt, während alle

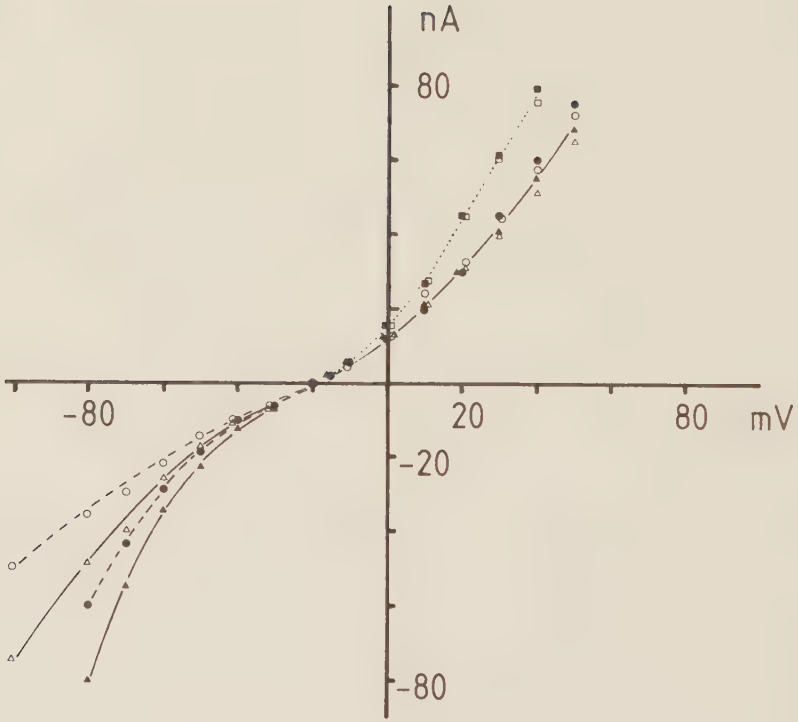


Abb.31. Effekt von $CoCl_2$ auf die Strom-Spannungs Kennlinie. Geschlossene Symbole: Ströme in Normalringer, gemessen im Maximum des schnellen Auswärtsstromes (■), nach 8o ms (●) und nach 5oo ms (▲). Offene Symbole: Ströme in $CoCl_2$-Ringer, ebenfalls gemessen im Maximum des schnellen Auswärtsstromes (□), nach 8o ms (○) und nach 5oo ms (△). Haltepotential: Jeweils 2o mV unter dem Ruhepotential dieses Neurons, das in diesem Fall nicht exakt festgestellt wurde. Die Kurven sind von Hand den Meßpunkten angepaßt.

anderen schwächer reagierten. Die Wirkung von $CoCl_2$ ähnelt in hyperpolarisierender Richtung de von Curare, ist allerdings nicht so ausgeprägt. Zusätzlich zeigen sich in Abb.31 leichte Änderungen in depolarisierender Richtung, die allerdings aufgrund der oben erwähnten Doppeldeutigkeiten schwer zu interpretieren sind. Der schnelle Auswärtsstrom. der ebenfalls in Abb.31 eingetragen ist, wird dagegen durch $CoCl_2$ nicht beeinflußt.

Wegen der unvollständigen Blockade aller synaptischen Aktivitäten durch Curare und $CoCl_2$ sind bis dato keine quantitativen Aussagen über die langsamen Ströme möglich. Da sie sich jedoch unter dem Einfluß sowohl von Curare als auch von $CoCl_2$ verstärken, muß man folgern, daß diese Ströme nicht überwiegend durch synaptische Vorgänge hervorgerufen werden. Wäre nämlich dies der Fall, müßte die Strom-Spannungs Kennlinie unter dem Einfluß beider Substanzen linearisiert werden. Die Kennlinien, die bei Einwirkung von Curare und $CoCl_2$ erhalten werden, spiegeln also besser als diejenigen in Normalringer die Membraneigenschaften der L-Neurone wider.
Da sich die Strom-Spannungs Kennlinien in positiver Richtung unter dem Einfluß von Curare und $CoCl_2$ jedoch nur wenig ändern, und somit Synapsen in dieser Richtung - wenn überhaupt - nur einen kleinen Effekt ausüben, wurde noch der Einfluß von Tetrodotoxin und 4-Aminopyridin auf die langsamen Ströme in positiver Richtung untersucht.

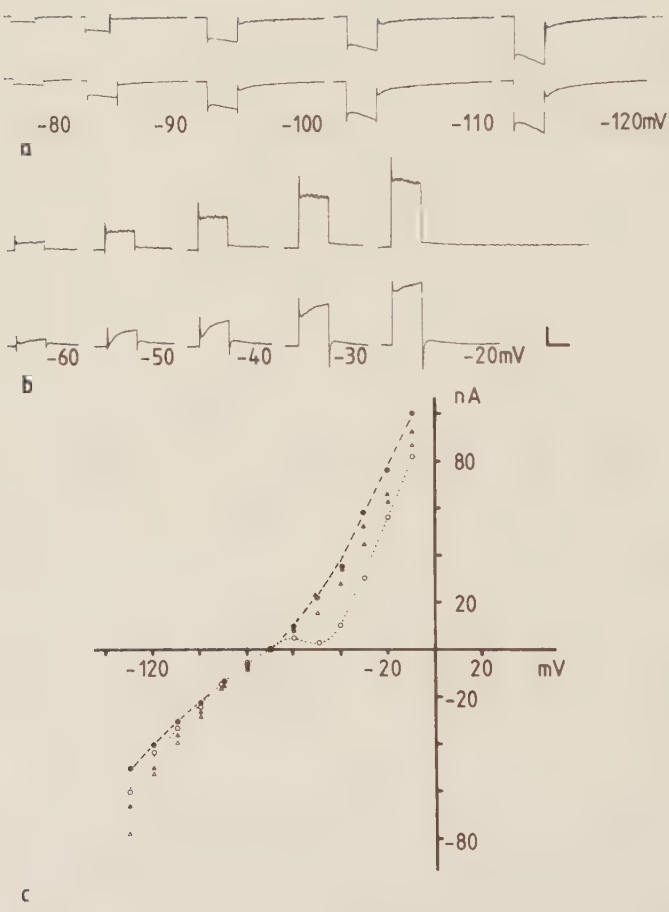


Abb.32. Effekt von 4-Aminopyridin auf die Ströme im Voltage-Clamp.
a: Klemmströme bei Potentialsprüngen vom Haltepotential -7o mV auf die angegebenen Werte. Negative Sprünge in Normalringer (obere Reihe) und 4-Aminopyridin-Ringer (untere Reihe). Die Spannungssprünge sind nicht dargestellt.
b: Wie a, aber positive Sprünge auf die angegebenen Werte. Obere Reihe: Ströme in Normalringer. Untere Reihe: Ströme in 4-Aminopyridin Ringer.
c: Strom-Spannungskennlinie der langsamen Ströme in Normalringer (geschlossene Symbole) und in 4-Aminopyridin-Ringer (offene Symbole), gemessen nach jeweils 8o ms (● , ○) und nach 5oo ms (▲ , △). Die Kurven wurden der Übersichtlichkeit halber nur für die Ströme nach 8o ms eingetragen. Sie sind den Meßwerten von Hand angepaßt.
Kalibrierung: in a und b: 2o nA, 4oo ms.

3.3.4.2 Beeinflußung der langsamen Ströme durch 4-Aminopyridin

Da Tetrodotoxin keinen meßbaren Einfluß auf die langsamen Ströme ausübt, wird dies hier nicht explizit dargestellt. Im Gegensatz dazu verändert 4-Aminopyridin die Strom-Spannungs Charakteristik der langsamen Ströme beträchtlich. Abb. 32 zeigt dies bei einem Haltepotential von -7o mV, wo die Änderungen am ausgeprägtesten sind. Während bei hyperpolarisierenden Spannungssprüngen von diesem Haltepotential nur geringe Abweichungen zu den Strömen in Normalringer feststellbar sind (Abb.32a), wird bei depolarisierenden Impulsen in 4-Aminopyridin-Ringer ein langsamer Nettoeinstrom sichtbar (Abb.32b). Dieser Strom, dessen Schwelle bei etwa -6o mV liegt (Abb.32c), war offensichtlich in Normalringer durch den schnellen Auswärtsstrom überdeckt. Das Zeitverhalten der Ströme in Normalringer bei Zeiten >ca. 3o ms spiegelt somit das Zeitverhalten der Überlagerung mindestens zweier Ströme wider: Erstens, des schnellen Auswärtsstromes, der nach ca. 3 ms seine stärkste Amplitude erreicht, danach wieder abklingt, aber nicht vollständig inaktiviert. Zweitens, eines Einwärtsstromes, der langsamer aktiviert und sein Maximum nach etwa 4o ms erreicht (s.Abb.32b).
Zusätzlich unterscheiden sich die Nachströme am Ende der Spannungsimpulse. In Normalringer ist lediglich ein Auswärtsnachstrom erkennbar, der die Inaktivierung von Auswärtsströmen widerspiegelt (Abb.32b), während in 4-Aminopyridin-Ringer der Nachstrom aus zwei Komponenten besteht.

Der relativ schnelle Einwärtsnachstrom beruht dabei höchstwahrscheinlich auf der Inaktivierung des Einwärtsstromes, der in den positiven Impulsen in Erscheinung tritt.
Der nachfolgende langsame Auswärts-Nachstrom könnte infolge einer unvollständigen Blockade der Kanäle des schnellen Auswärtsstromes oder durch einen zusätzlichen, 4-Aminopyridin-insensitiven Auswärtsstrom erklärt werden.

Wenn man die Komplikationen durch synaptische Rückkopplungseffekte an dieser Stelle einmal beiseite läßt, kommt als Ursache für den Einwärtsstrom nur eine spannungsabhängige Kalziumleitfähigkeit in Frage. Diese müßte durch $CoCl_2$ blockierbar sein, was wegen der fraglichen Wirkung von $CoCl_2$ in diesem Präparat aber bis jetzt noch nicht geklärt werden konnte.
Aus Abb.32 wird allerdings auch klar, warum bei verschiedenen L-Neuronen der genaue Stromverlauf bei depolarisierenden Impulsen unterschiedlich sein kann (s. 3.3.1). Überwiegt der Einfluß des schnellen Auswärtsstromes, dann wird bei negativen Haltepotentialen die Überlagerung von Ein- und Auswärtsstrom wie in der oberen Reihe von Abb.32b aussehen. Ist der schnelle Auswärtsstrom nur schwach ausgeprägt und der langsamere Einwärtsstrom stärker, dann ergibt sich mehr ein Erscheinungsbild wie in der unteren Reihe von Abb.32b. Je nach Anteil der verschiedenen Ströme sind auch sämtliche Übergangsformen vorstellbar.

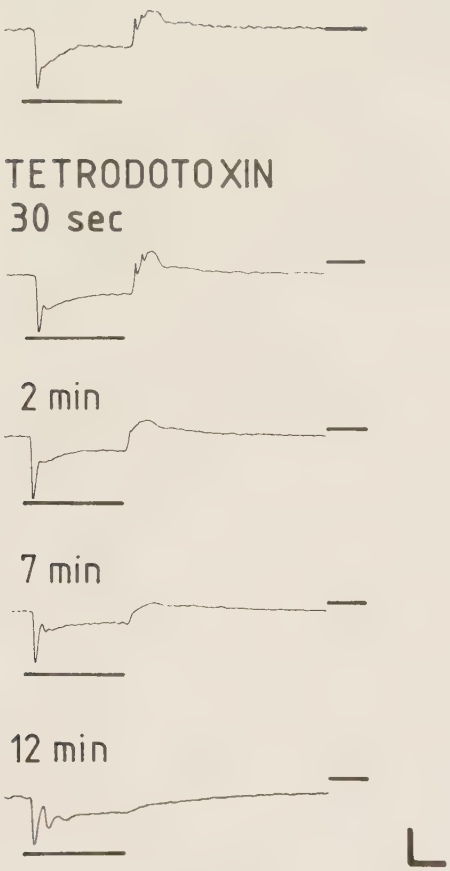


Abb.33. Einfluß von Tetrodotoxin auf die Lichtantwort eines L-Neurons. Oberste Spur: Lichtantwort in Normalringer. Spur 2 - 5: Lichtantworten in Tetrodotoxin-Ringer zu den jeweils angegebenen Zeiten nach Lösungswechsel. Lichtintensität jeweils -2.1. Die Balken geben die Dauer der Lichtreize an, und die Linien nach Ende jeder Spur das Niveau des Ruhepotentials in Normalringer. Kalibrierung: 2o mV, 4o ms.

3.3.5 Einflüße der verschiedenen Pharmaka auf die lichtinduzierten Potentialänderungen der L-Neurone

Während die Einflüsse von Curare und von $CoCl_2$ auf die Lichtantworten der L-Neurone bereits von Klingman & Chappell (1978) und Wilson (1978c) beschrieben wurden, gibt es keine Literatur über die Effekte der anderen in dieser Arbeit verwendeten Pharmaka. Aus diesem Grund und weil es die Möglichkeit bietet, die aus den Voltage-Clamp Versuchen vorhersagbaren Effekte zumindest qualitativ zu überprüfen, sollen diese Einflüße hier vorgestellt werden. Dabei können allerdings nicht alle Veränderungen auf die Beeinflußung der spannungssensitiven Leitfähigkeiten zurückgeführt werden, da man über die Auswirkungen dieser Pharmaka auf die anderen Neurone im Nerv zuwenig weiß.

3.3.5.1 Tetrodotoxin

Aus den Voltage-Clamp Versuchen mit Tetrodotoxin muß man folgern, daß bei einer Lichtantwort der "fast off transient" verschwindet, der ja einem durch Lichtreizende erregtem "anode breakdown spike" entspricht. Falls zusätzlich noch synaptische Eingänge von spikenden Neuronen auf L-Neurone existieren, sollte sich deren Wirkung ändern, da höchstwahrscheinlich die spikenden Neurone durch Tetrodotoxin gehemmt werden.
Abb.33 stellt den Effekt von Tetrodotoxin auf die Lichtantwort eines L-Neurons dar. Neben dem Verschwinden des

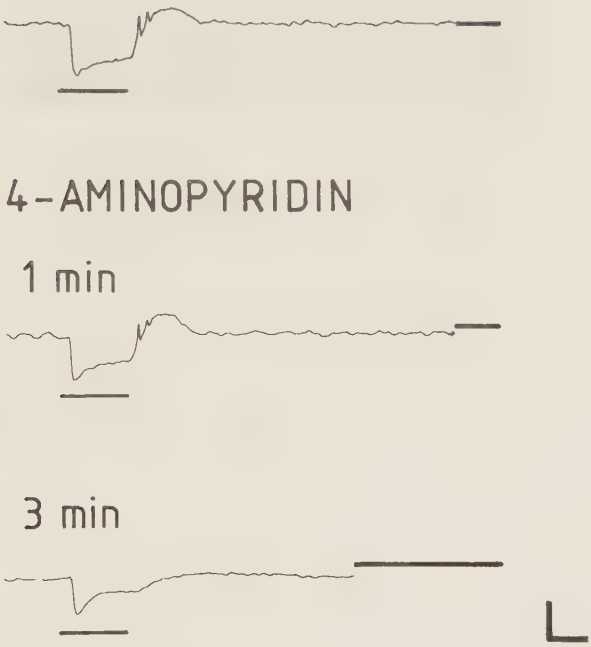


Abb.34. Einfluß von 4-Aminopyridin auf die Lichtantwort eines L-Neurons.
Oberste Spur: Lichtantwort in Normalringer.
Mittlere Spur: Lichtantwort nach 1 min in 4-Aminopyridinringer.
Untere Spur: Lichtantwort nach 3 min in 4-Aminopyridinringer. Die Balken unter den Lichtantworten kennzeichnen die Dauer der Lichtreize und die Linien am Ende jeder Spur das Niveau des Ruhepotentials in Normalringer. Lichtintensität = -2,1.
Kalibrierung: 2o mV, 4o ms.

"fast off transients", das infolge der Tetrodotoxin-Empfindlichkeit des schnellen Einwärtsstromes zu erwarten ist, klingt auch der "slow off transient" ab, und es bleibt eine lange, negative Nachpolarisation nach Ende des Lichtreizes. Zusätzlich entsteht nach längerer Tetrodotoxin-Einwirkung am Anfang der Plateauphase ein Einschwingvorgang. Außerdem sinkt das Ruhepotential um ca. 1o mV, wodurch die Amplitude der on-Spitze kleiner wird.
Da Tetrodotoxin keinen Einfluß auf die langsamen Ströme im Voltage-Clamp ausübt, müssen diese Änderungen der langsamen Phasen der Lichtantwort durch veränderte Erregung anderer Neurone verursacht werden. Dabei müssen - wie erwähnt - die spikenden Neurone als wichtigste Kandidaten gelten, wobei man allerdings nicht vergessen darf, daß eventuell auch die Lichtantwort der Rezeptorzellen durch Tetrodotoxin verändert wird.

3.3.5.2 4-Aminopyridin

Auch 4-Aminopyridin verändert die Lichtantwort der L-Neurone, wie dies in Abb.34 dargestellt ist. Das Ruhepotential sinkt um ca. 1o mV, wodurch die on-Spitze kleiner wird, und der Aufstrich zur Plateauphase erfolgt schneller als ohne 4-Aminopyridin. Letzteres kann man aus den Voltage-Clamp Versuchen folgern, bei denen ein langsamer Einwärtsstrom sichtbar wurde, der bei der Lichtantwort in 4-Aminopyridin eine Depolarisation erzeugen sollte. Als Folge dieser langsamen Depolarisation wird das Membranpotential beim Übergang von

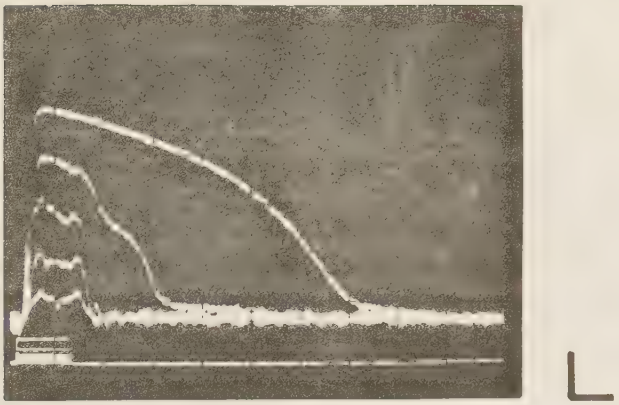


Abb.35. Lichtantwort eines Rezeptors in 4-Aminopyridin auf Lichtreize der rel. Intensitäten -2,4; -1,8; -1,2; -o,6 und O (von unten nach oben). Die untere Spur gibt die Dauer der Lichtreize wieder. Überlagerung von fünf Oszillographenüberläufen.
Kalibrierung: 1o mV, 1oo ms.

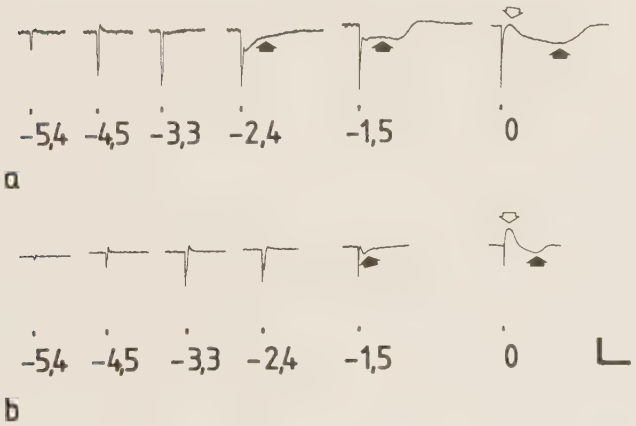


Abb.36. Effekt von 4-Aminopyridin auf die langen Nachwellen der Lichtantwort eines L-Neurons bei starken Lichtintensitäten.
a: Lichtantwort in Normalringer auf Lichtreize der angegebenen Intensitäten.
b: Wie a, jedoch in 4-Aminopyridin-Ringer. Die Lichtreizung erfolgte in a und b mit 1o s Dunkelpause. Die Punkte unter den Lichtantworten geben die Dauer des Lichtreizes wieder. Man beachte die langsame Zeitablenkung der Registrierung. (▲) = negative Nachwelle, (△) = positive Nachwelle.
Kalibrierung: 1o mV, 2 s.

der on-Spitze zur Plateauphase offensichtlich langsam über die Schwelle des "Aktionspotentials" geschoben, ohne daß dieses ausgelöst wird. Dieser Vorgang, der allgemein als "Einschleichen" bekannt ist, läuft offenbar auch in normalen Lichtantworten ab, da sonst beim Übergang von stark negativen on-Spitzen zur Plateauphase ein "Aktionspotential" ausgelöst werden müsste. Das Verschwinden der "fast off transients" in der Lichtantwort der Abb.34 ist dann darauf zurückzuführen daß das Plateau positiver liegt als in Normalringer und dadurch die Kanäle für den schnellen Einwärtsstrom inaktiviert sind. Zusätzlich wird auch der "slow off transient" kleiner, was eher wieder auf Effekte von anderen Neuronen zurückgeführt werden kann. Aus den gleichen Gründen wie vorher ist eine genaue Interpretation der Änderungen allerdings auch hier unmöglich, da über die Wirkung von 4-Aminopyridin auf die anderen Neurone zu wenig bekannt ist.
Wie Abb.35 zeigt, sind aber zumindest die Rezeptoren in 4-Aminopyridin noch voll funktionsfähig. Die Amplitude der Lichtantwort ist in diesem Fall, bei dem im selben Präparat wie in Abb.34 abgeleitet wurde, sogar sehr hoch, wobei allerdings die Kontrolle zur Antwort in Normalringer fehlt.

In Abb.36 sind zusätzlich noch die Lichtantworten eines L-Neurons vor und nach Spülung mit 4-Aminopyridin-Ringer und bei verschiedenen Reizintensitäten dargestellt. Die Lichtreize wurden dabei mit langer Dunkelpause gegeben. Dabei werden die langen Nachpotentiale deutlich, die bei

höheren Intensitäten auftreten, und die bisher in der Literatur noch nicht beschrieben wurden (Abb.36a). Unter dem Einfluß von 4-Aminopyridin verschwindet dabei die lange, negative Nachwelle fast völlig, während die etwas kürzere, positive Welle erhalten bleibt. Am Beispiel von Abb.36 zeigt sich deutlich, daß 4-Aminopyridin auch andere Neurone beeinflußen muß, da diese langen Nachwellen keine spannungsabhängige sondern lichtreizabhängige Vorgänge sind.

4. DISKUSSION

4.1 Die Eignung der L-Neurone für membranphysiologische Fragestellungen

In der vorliegenden Arbeit wurden einige grundlegende Membraneigenschaften nichtspikender Neurone am Beispiel der L-Neurone im Ocellusnerv von Locusta migratoria näher untersucht.
Voraussetzung dafür ist das einwandfreie Funktionieren der Neurone, auch unter den relativ künstlichen Bedingungen der angewandten Präparationsmethode. Aus der Literatur sind die normalen Antworteigenschaften der L-Neurone ziemlich gut bekannt, wobei zum Teil Ableitungen an ganzen, fast völlig intakten Tieren vorgenommen wurden, bei denen nur die Kopfkapsel geöffnet wurde (Simmoms 1982b, Wilson 1978b). Von solchen Versuchen kann man mit Recht behaupten, daß deren Ergebnisse unter möglichst physiologischen Bedingungen gewonnen wurden, wie dies sonst nur bei wenigen Präparaten der Fall ist.
Ein Vergleich der lichtinduzierten Potentialänderungen von Abb.6, Abb.8 und Abb.9 in dieser Arbeit mit den Ergebnissen anderer Autoren zeigt deutlich, daß die L-Neurone auch nach der in dieser Arbeit angewandten Präparationsmethode noch einwandfrei funktionieren (Patterson & L.J.Goodman 1974, Simmons 1981, 1982a, Wilson 1978a, 1978b, 1978c, Taylor 1981). Die maximalen Amplituden der Lichtantworten im Sättigungsbereich, die zwischen -2o mV und - 35 mV liegen,

entsprechen denen anderer Untersuchungen des Heuschreckenocellus, und auch die Abhängigkeit der Amplituden von der Lichtintensität stimmt mit den Ergebnissen von Patterson und L.J.Goodman (1974) und von Wilson (1978b) überein.
Die Form der Lichtantworten bei den verschiedenen Reizintensitäten ist im Rahmen der Variationsbreite völlig mit den bisher vorliegenden Untersuchungen identisch. Auch das Verhalten bei längerer Dunkeladaptation entspricht Ergebnissen von Patterson und L.J.Goodman (1974).
Zusätzlich kann aus den Ableitungen von den Rezeptoren und deren Intensitäts-Antwort Kurven, sowie aus den Ableitungen von spikenden Neuronen auf die Intaktheit des ganzen Präparates geschlossen werden. Damit liegt mit dieser Art der Ocelluspräparation ein Versuchsobjekt vor, an dem relativ gut mit zwei Elektroden aus einer Zelle abgeleitet werden kann, das lange und stabile Ableitperioden erlaubt und das für pharmakologischen und ähnliche Manipulationen sehr gut geeignet ist.
Wie die vorliegenden Ergebnisse außerdem zeigen, sind auch Voltage-Clamp Versuche an den L-Neuronen erfolgreich durchführbar, so daß membranphysiologische Fragestellungen gut untersucht werden können. Dabei müssen allerdings drei einschränkende Gesichtspunkte erwähnt werden. Der erste ist prinzipieller Natur und betrifft Voltage-Clamp Versuche mit hochohmigen Mikroelektroden. Unter dieser Bedingung sind die Schnelligkeit des Voltage-Clamp und der maximal einsetzbare Strom beschränkt, so daß die Untersuchungsmöglichkeiten im Vergleich zu anderen Voltage-Clamp Methoden geringer sind.

Dieses Problem betrifft aber alle Voltage-Clamp Untersuchungen an relativ kleinen neuronalen Strukturen. Dabei bieten L-Neurone den Vorteil, daß mit zwei Elektroden Voltage-Clamp durchgeführt werden kann und nicht auf die Methode des Ein-Elektroden Voltage-Clamps zurückgegriffen werden muß, dessen Zeitverhalten und Strominjektionskapazität noch beträchtlich schlechter sind (Wilson & Goldner 1975). Als zweite Einschränkung verfälscht der Serienwiderstand im vorliegenden Präparat, der nie völlig kompensiert werden konnte, die Spannungsmessung in den Voltage-Clamp Meßreihen. Dies bringt bei höheren Klemmströmen Veränderungen der Strom-Spannungs Kennlinien mit sich, die eine quantitative Beurteilung erschweren. Drittens ergibt sich durch die in situ Untersuchung das Problem der Interferenz von synaptischen Leitfähigkeitsänderungen mit spannungssensitiven Leitfähigkeitsänderungen, das bis jetzt noch nicht befriedigend gelöst werden konnte. Hier liegt noch eine Aufgabe für die Zukunft, um die Ergebnisse der langsamen Ströme stichhaltiger zu machen.

Die letzte Einschränkung kann allerdings auch unter dem positiven Aspekt der neuronalen Verarbeitung betrachtet werden. Unter diesem Gesichtspunkt bieten L-Neurone sehr gute Möglichkeiten, synaptische Übertragungen und deren Wechselwirkung mit spannungssensitiven Kanälen, sowie pharmakologische Fragestellungen zu studieren - dies alles unter möglichst physiologischen Bedingungen.

Abschließend zu diesem Punkt läßt sich feststellen, daß L-Neurone grundsätzlich für membranphysiologische Unter-

suchungen geeignet sind. Dabei können zwar nicht mit derselben Präzision, wie zum Beispiel beim Tintenfischaxon oder bei den Aplysianeuronen, die biophysikalischen Parameter spannungsabhängiger Kanäle bestimmt werden, aber es lassen sich durchaus grundlegende Eigenschaften nichtspikender Neurone untersuchen. Für die Zukunft bieten sich außerdem interessante Fragestellungen im Hinblick auf Verarbeitungsmechanismen und pharmakologische Beeinflußungen nichtspikender Neurone, sowie deren Zusammenwirken mit spikenden Neuronen an.

4.2 Die passiven Membraneigenschaften der L-Neurone

Bisher lagen noch keine experimentellen Untersuchungen über die passiven Membraneigenschaften der L-Neurone vor, so daß in der Literatur immer auf Werte anderer Nervenzellen zurückgegriffen werden mußte. Die Resultate der Current-Clamp Experimente und der Zeitkonstantenbestimmung belegen, daß sich L-Neurone in ihren passiven Membraneigenschaften nicht grundsätzlich von anderen Neuronen unterscheiden (s.Tab.4). Insbesondere ist die Längskonstante λ mit 1,6 mm groß genug, um die elektrotonische Übertragung von Potentialänderungen vom Ocellus ins Oberschlundganglion zu gewährleisten, wie dies von Wilson (1978b) gefolgert wurde. Auch sind die Werte, die er für den Membranwiderstand abschätzt, sehr nahe an den gemessenen Werten der vorliegenden Untersuchung. Ebenso stimmen die Mittelwerte des Eingangswiderstandes, den Wilson mit 1,74 MΩ angibt, innerhalb der Fehlergrenzen überein.

In den Versuchen mit Curare zeigte sich, daß der Eingangswiderstand in hyperpolarisierender Richtung bei Blockade der Rezeptorsynapsen zunimmt. Das heißt, daß im Normalzustand offensichtlich synaptische Kanäle zum Teil offen sind. Für die Bestimmung der passiven Membranparameter bedeutet dies, daß der Eingangswiderstand, der an der Stelle der Elektrodeneinstiche gemessen wurde, die synaptische Leitfähigkeit beinhaltet. Somit ist der gemessene Wert niedriger, als er ohne synaptischen Einfluß wäre. Die passiven Membranparameter dieser Untersuchung spiegeln also nicht exakt die Eigenschaften der nichtsynaptischen Membran wider.
Für die Beurteilung der Übertragungseigenschaften sind allerdings die gemessenen Werte mit synaptischem Einfluß bedeutsamer, da sie den physiologischen Zustand wiedergeben. Das heißt, eine lichtinduzierte Potentialänderung, wie sie im Axon gemessen wird, ist den Auswirkungen dieser Membranparameter unterworfen. Aus dem Curareeffekt ergibt sich außerdem die Schlußfolgerung, daß sich durch synaptische Einwirkung die elektrotonische Ausbreitung eines Signals beeinflußen läßt. Dies kann vor allem für L-Neurone ein Mechanismus der Signalbeeinflußung sein, da diese Zellen auch entlang des Axons synaptische Verbindungen mit anderen Neuronen aufweisen, die die Membraneigenschaften verändern können. Dabei kann allein die Variation eines tonischen synaptischen Eingangs die Übertragungseigenschaften eines L-Neurons beeinflußen - ein Aspekt, der bisher in der allgemeinen Diskussion kaum berücksichtigt wurde (L.J.Goodman 1981). Dies könnte ein wichtiger Mechanismus sowohl für die efferente Beeinflußung der Signalübertragung als auch für Adaptationsphänomene sein.

4.3 "Aktionspotentiale" in nichtspikenden Neuronen?

Die L-Neurone im Ocellusnerv von Locusta entsprechen in allen Punkten der Definition für nichtspikende Neurone, wie sie von Pearson und Fuortner (1975) aufgestellt wurde, nämlich: (1) ein geringes Ruhepotential (-3o mV bis -5o mV), (2) auffällige Fluktuationen des Ruhepotentials ("Rauschen"), (3) graduierte Antworten auf adäquate Reize, (4) die Unmöglichkeit, durch Depolarisationen Aktionspotentiale zu erzeugen, und (5) graduierte Übertragung der Signale über chemische Synapsen in jeder Polarität. Die ersten vier Punkte dieser Definition sind aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ersichtlich und der fünfte Punkt wurde durch eine Arbeit von Simmons (1982a) nachgewiesen.
Deswegen erscheint es auf den ersten Blick paradox, wenn man von "Aktionspotentialen" in nichtspikenden Neuronen berichtet. Die Current-Clamp Versuche in 3.2 beweisen jedoch eindeutig, daß regenerative Membranpotentiale in L-Neuronen erregbar sind. Sie besitzen somit, nach der in der Einleitung erwähnten Definition von Rall (1977), aktive Membraneigenschaften. Ähnliche Ergebnisse zeigen die Arbeiten von Hengstenberg (1977), Wilson (1978b) und Simmons (1982a), wobei in allen Fällen die Neurone erst durch Ströme vorpolarisiert werden mußten, um "Aktionspotentiale" erzeugen zu können. Trotz dieser paradoxen Situation scheint es sinnvoll zu sein, den Begriff und die Definition für nichtspikende Neurone beizubehalten, um damit Nervenzellen zu bezeichnen, die im Normalzustand keine Aktionspotentiale generieren. Allerdings kann man

diese Neurone nicht mehr prinzipiell von spikenden Nervenzellen abgrenzen, sondern man muß nach den speziellen Eigenschaften nichtspikender Neurone fragen, die sie von "normalen" Nervenzellen unterscheiden.

4.4 Das Ruhepotential der L-Neurone

Simmons (1981) berichtet von einem mittleren Ruhepotential der L-Neurone von -32 mV, während in dieser Arbeit ein Mittelwert von -41 mV gemessen wurde. Andere Autoren geben keine Werte für das Ruhepotential an, so daß nicht entschieden werden kann, welches Potential dem wahren Ruhepotential am nächsten kommt. Da im allgemeinen Nervenzellen depolarisieren, falls sie durch einen Elektrodeneinstich beschädigt werden, erscheint der Wert der vorliegenden Arbeit wahrscheinlicher und deutet darauf hin, daß die L-Neurone in diesem Präparat wenig verletzt wurden. Auf alle Fälle bedeuten beide Werte, daß das Ruhepotential im Vergleich zu spikenden Neuronen positiver liegt. In dieser Tatsache steckt der Hauptgrund, daß L-Neurone - und wohl auch viele andere nichtspikende Neurone - im Normalfall keine Aktionspotentiale generieren.

Wie die Versuche mit Tetrodotoxin beweisen, stellt der schnelle Einwärtsstrom die ionale Grundlage des "Aktionspotentials" im Current-Clamp und des "fast off transients" der Lichtantwort dar (Abb.22 und Abb.33). Aus der näheren Untersuchung dieses schnellen Einwärtsstromes folgt, daß beim Ruhepotential von -41 mV fast alle Kanäle inaktiviert sind (Abb.21), so daß

keine ausreichende Erregung mehr möglich ist. Außerdem liegt dieses Potential weit über der Schwelle des schnellen Einwärtsstromes (Abb.2o)..

Aus dem Vergleich der Kurven in Abb.2o und Abb.21 läßt sich eine wichtige Ursache für das erhöhte Ruhepotential ablesen. Da sich die Aktivierungskurve (Abb.2o) und die Inaktivierungskurve (Abb.21) in einem weiten Spannungsbereich von ca. -65 mV bis -4o mV überlagern, ist ein starker, sogenannter "window current" zu erwarten (Adams 1982). Dieser Strom entsteht dadurch, daß auch bei einem Potential über der Schwelle die Kanäle des schnellen Einwärtsstromes noch zum Teil aktivierbar sind - jedoch nicht so stark, daß ein regenerativer Prozeß entsteht. Dies zeigt sich deutlich in Abb.13a, wo depolarisierende Stromimpulse vom Ruhepotential aus kleine lokale Antworten erzeugen. Da das Öffnen und Schließen von Ionenkanälen ein statistischer Prozeß ist, dessen Wahrscheinlichkeit durch das Membranpotential bestimmt wird (Sigworth & Neher 198o), ergibt sich in diesem Überlappungsbereich ein tonischer, depolarisierender Strom. Zusätzlich spricht für das Vorhandensein eines "window currents" das "Rauschen" der Zellen, das unter anderem als Folge dieser Schwankungen des Öffnungszustandes der Kanäle interpretiert werden kann (Hengstenberg 1977). Dies zeigt sich z.B. in Abb.13b, in der negative Ströme das Rauschen der Zellen stark vermindern. Durch die Stromeinprägung wird das Membranpotential unter den Überlappungsbereich der Aktivierungs- und Inaktivierungskurve und unter die Schwelle des schnellen Einwärtsstromes gedrückt, so daß die Wahrscheinlichkeit zum Öffnen der Kanäle stark

verringert wird. Ein drittes Indiz, daß das erhöhte Ruhepotential zumindest zum Teil durch statistische Schwankungen der Kanäle des schnellen Einwärtsstromes zwischen offenem und geschlossenem Zustand zu erklären ist, folgt aus den Versuchen mit Tetrodotoxin (Abb.33). Auch hier wird das "Rauschen" verringert und das Ruhepotential sinkt um ca. 1o mV. Da Tetrodotoxin die Kanäle des schnellen Einwärtsstromes blockiert, zeigt dies deutlich, daß diese an der Generierung des Ruhepotentials beteiligt sind und die L-Neurone um etwa 1o mV depolarisieren. Somit läßt sich das erhöhte Ruhepotential zum Teil durch einen andauernden Einwärtsstrom durch Tetrodotoxin-sensitive Kanäle erklären.

Aus dem Umkehrpotential des schnellen Auswärtsstromes folgt eine zweite Ursache für das erhöhte Ruhepotential. Da aus den Versuchen mit 4-Aminopyridin geschlossen werden kann, daß es sich bei diesem Auswärtsstrom um einen Kaliumstrom handelt (s.4.5), heißt dies, daß das Kaliumgleichgewichtspotential bei ca. -75 mV liegt, also weniger negativ, als die üblicherweise angenommenen -9o mV bis -11o mV. Aus diesem Grund sollte das Membranpotential auch einen positiveren Wert als bei anderen Neuronen besitzen. Niedrige Kaliumgleichgewichtspotentiale wurden auch bei anderen Invertebratenzellen nachgewiesen, so daß der Wert von -75 mV nicht sehr ungewöhnlich erscheint (Salkoff & Wyman 1983, Mirolli 1984).
Aus den Werten des Kaliumgleichgewichtspotentials (Abb.27, E_K) und aus dem Umkehrpotential des schnellen Einwärtsstromes,

der höchstwahrscheinlich durch Natriumionen hervorgerufen wird (Abb.2o, E_{Na}), lassen sich mit Hilfe der Nernstschen Gleichung die Verhältnisse der Ionenkonzentrationen zwischen extrazellulärem und intrazellulärem Milieu berechnen.

$$E_C = 58 \lg \frac{[C^+]_a}{[C^+]_i} \qquad (Gl.8)$$

(E_C = Gleichgewichtspotential des Kations C; $[C^+]_a$ = Konzentration im Extrazellulärraum; $[C^+]_i$ = Konzentration im Intrazellulärraum).

Für E_K = -75 mV ergibt sich ein Wert von $[K^+]_a : [K^+]_i$ von 0,051 : 1 und für E_{Na} = 4o mV folgt $[Na^+]_a : [Na^+]_i$ = 4,89 : 1. Unter der berechtigten Annahme, daß die Kalium- und Natriumkonzentrationen der Ringerlösung den extrazellulären Konzentrationen entsprechen (Treherne 1972, 1974), ergeben sich intrazelluläre Konzentrationen von $[K^+]_i$ = 98 mM/l für Kalium ($[K^+]_a$ = 5 mM/l) bzw. von $[Na^+]_i$ = 35 mM/l für Natrium ($[Na^+]_a$ = 17o mM/l). Dies entspricht durchaus gemessenen Werten von Insektenaxonen (Treherne 1974).

Damit läßt sich aus der Goldmanschen "constant field" Gleichung

$$U_m = 58 \lg \frac{p_K[K^+]_a + p_{Na}[Na^+]_a + p_{Cl}[Cl^-]_i}{p_K[K^+]_i + p_{Na}[Na^+]_i + p_{Cl}[Cl^-]_a} \qquad (Gl.9)$$

(U_m = Membranpotential; p_K, p_{Na}, p_{Cl} = Kalium-, Natrium- und Chloridpermeabilitäten; $[K^+]_a$, $[Na^+]_a$, $[Cl^-]_a$ = extrazelluläre Kalium-, Natrium- und Chloridkonzentrationen; $[K^+]_i$, $[Na^+]_i$, $[Cl^-]_i$ = intrazelluläre Konzentrationen) nach Umformung und unter Vernachlässigung des Chloridanteils bei bekanntem U_m das Verhältnis $p_{Na} : p_K$ berechnen.

Für das durchschnittliche Ruhepotential der L-Neurone von U_m = -41 mV ergibt sich mit den angegebenen Konzentrationen ein Verhältnis von 0,087 : 1, welches aufgrund des "window currents" relativ groß ist. Da durch Tetrodotoxin-Einwirkung die Kanäle des Einwärtsstromes blockiert werden, und damit der "window current" unterdrückt wird, sinkt das Ruhepotential auf ca. -51 mV. Die analoge Berechnung ergibt nun einen Wert von $p_{Na} : p_K$ = 0.048 : 1, der im Bereich der Literaturwerte liegt (Hodgkin 1957, Harris & Martius-Ferreira 1955, Hille 1977).

Da über die genauen intrazellulären und extrazellulären Ionenkonzentrationen im Ocellusnerv nichts bekannt ist, kann diese Berechnung natürlich nicht das Zustandekommen des erhöhten Ruhepotentials beweisen.

Trotzdem zeigt sie, daß es ohne weiteres möglich ist, mit Hilfe der Natrium- und Kaliumgleichgewichtspotentiale und einer auch bei anderen Nervenzellen üblichen, Tetrodotoxin-insensitiven Natriumleckleitfähigkeit, ein Ruhepotential von etwa -5o mV zu erreichen. Damit befindet sich das Membranpotential im Überlappungsbereich der Aktivierungs- und Inaktivierungskurve des Natriumstromes, wodurch ein zusätzlicher depolarisierender Einfluß infolge des "window currents" auftritt.

4.5 Die schnellen Ströme im Voltage-Clamp

Die pharmakologische Charakterisierung der schnellen Ein- und Auswärtsströme erlaubt es, sie mit denen anderer Neurone zu vergleichen. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß eine Gleichsetzung der verschiedenen Ionenströme in unterschiedlichen Präparaten sehr schwierig ist. Die Ergebnisse einer Reihe von Untersuchungen zeigen, daß bei verschiedenen Präparaten die biophysikalischen Parameter einzelner Ionenkanäle im allgemeinen differieren, woraus zum Teil die sehr unterschiedliche Funktionsweise verschiedener Neurone resultiert (Molluskensoma: Adams et al. 198o, Tintenfischaxon: Hodgkin & Huxley 1952, Rattenaxon: Brismar 198o, Froschaxon: Frankenhaeuser & Huxley 1964, Rückenmarkganglienzellen: Kostyuk et al. 1981a, 1981b, 1981c, Vertebraten - allgemein: Adams 1982). Da über L-Neurone noch keine Voltage-Clamp Daten vorliegen, können die Ergebnisse dieser Arbeit nur mit denen anderer Neurone verglichen werden, wobei immer gewisse Differenzen zu erwarten sind.

Die Kanäle des schnellen Einwärtsstromes sind offensichtlich Tetrodotoxin-sensitiv, so daß sie den Natriumkanälen des Tintenfischaxons gleichen (Narahashi 1974). Die relativ hohe Tetrodotoxin-Konzentration, die zur Blockierung des schnellen Einwärtsstromes bei L-Neuronen nötig ist, läßt sich dabei auf das noch intakte Perineurium zurückführen, welches offenbar die Diffusion beschränkt. Auch die Konzentrationen der anderen verwendeten Pharmaka mußten höher als normalerweise üblich gewählt werden, um meßbare Effekte zu erzielen.

Da auch die Aktivierungskurve und das Zeitverhalten des schnellen Einwärtsstromes im Rahmen der bei anderen Neuronen gefundenen Werte für Natriumströme liegen, soll dieser Strom mit I_{Na} bezeichnet werden (Hille 1977, Pichon 1974). Die Aktivierungskurve der Abb.2o zeigt dabei wegen der in diesen Messungen nicht vorgenommenen Serienwiderstands-Kompensation einen etwas verzerrten Verlauf. In einer Arbeit von Humes & Giles (1983) sind Aktivierungskurven des Natriumstromes von Atriumzellen mit und ohne Kompensation dargestellt. Mit Serienwiderstands-Kompensation bleibt dabei die Schwelle beim gleichen Potential, das Maximum des Einwärtsstromes und das Umkehrpotential werden aber nach positiveren Spannungen verschoben. Auf die vorliegende Arbeit übertragen bedeutet dies, daß das Maximum des Einwärtsstromes positiv von -6o mV und das Umkehrpotential positiv von + 4o mV liegen. Bei Berücksichtigung dieser Verschiebungen gleicht die Kennlinie des schnellen Einwärtsstromes derjenigen von Natriumströmen an Insektenaxonen ziemlich gut (Pichon 1974).

Ein deutlicher Unterschied besteht allerdings in der Stromdichte, die sich in etwa aus der Abb.2o und aus den morphologischen Daten errechnen läßt. Dabei wird angenommen, daß die Kanäle relativ gleichmäßig über die Oberfläche des Axons verteilt sind. Bei den L-Neuronen ergibt sich dann ein Wert für die maximale Stromdichte des Einwärtsstromes, der bei ca. o,o45 mA/cm^2 liegt. Dies ist etwa zwanzigmal weniger, als die maximale Stromdichte in spikenden Schabenaxonen, die um 1 mA/cm^2 beträgt. Darin dürfte ein wichtiger Grund für die kleine Amplitude der "Aktionspotentiale" liegen (Pichon 1974).

Die Inaktivierungskurve gleicht ebenfalls den aus der Literatur bekannten Kurven (Crill & Schwindt 1983, Hille 1977, Pichon 1974). Ungewöhnlich ist allerdings die bereits erwähnte, breite Überlappung der beiden Kennlinien. Leider sind in den Arbeiten von Mirolli (1981, 1984), der in den Dendriten nichtspikender Coxarezeptoren von Krebsen ebenfalls Natriumströme nachgewiesen hat, nicht beide Kennlinien angegeben. Deswegen kann nicht nachgeprüft werden, ob dies eine typische Eigenschaft nichtspikender Neurone mit Natriumkanälen darstellt.
Zusätzlich zu diesen schnellen Natriumströmen weist Mirolli (1981, 1984) auch schnelle Auswärtsströme nach, die denen in dieser Arbeit gleichen. Die Überlagerung der beiden Ströme führt dabei zu einer Kennlinie, die derjenigen in Abb.2o bei Normalringer entspricht (Mirolli 1981). Auch in diesen Streckrezeptoren können kleine "Aktionspotentiale" von ca. 2o mV Amplitude erregt werden, die nie das Spannungsnullniveau überschreiten. Mirolli folgert daraus, daß der schnelle Auswärtsstrom die Amplitude der "Aktionspotentiale" begrenzt, wie dies auch in dieser Arbeit getan wird.
Dieser schnelle Auswärtsstrom gleicht in Zeitverhalten und Kennlinie dem "transient potassium current" (I_A), der zuerst von Connor & Stevens (1971) nachgewiesen, und inzwischen in ähnlicher Form in einer Vielzahl von Nerven- und Muskelzellen bestätigt wurde (Adams et al. 198o, Gustafson et al. 1982, Salkoff & Wyman 1983, Tachibana 1983b). In Mollusken-, Rückenmarks- und Hippocampusneuronen kann dieser schnelle Auswärtsstrom selektiv mit 4-Aminopyridin blockiert werden,

was mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit übereinstimmt (Segal & Barker 1984, Segal et al. 1984, Thompson 1982). In diesem Arbeiten wird auch die von Conner & Stevens (1971) bewiesene Kaliumselektivität bestätigt. Darum wird auch in der vorliegenden Untersuchung gefolgert, daß es sich um einen Kaliumstrom handelt - was auch durch die Bestimmung des Umkehrpotentials naheliegt - der dem "transient potassium current" entspricht. Aus diesem Grund soll der schnelle Auswärtsstrom mit I_A bezeichnet werden.

4.6 Die anormale Gleichrichtung

Neben den schnellen Strömen I_{Na} und I_A, die man als Folge aktiver Membraneigenschaften betrachten muß, zeigen die Kennlinien der L-Neurone noch weitere Nichtlinearitäten (s.Abb.17, Abb.3o, Abb.31 und Abb.32). Diese zusätzlichen spannungsabhängigen Leitfähigkeiten erzeugen offensichtlich keine regenerativen Prozesse. Sie wirken dafür aber auf die Integration postsynaptischer Potentiale und beeinflußen die Erregbarkeit der Neurone. Von diesen langsameren Vorgängen scheint vor allem die anormale Gleichrichtung von Bedeutung zu sein.

Der Begriff "anormale Gleichrichtung" oder auch "Einwärtsgleichrichtung" wurde zur Abgrenzung gegen die "normale" oder auch "verzögerte Gleichrichtung" eingeführt (Katz 1949). Die normale Gleichrichtung tritt bei depolarisierenden Stromimpulsen vom Ruhepotential aus auf und wird bewirkt durch das Öffnen von Kaliumkanälen, die z.B. im Tintenfischaxon

für die Repolarisation des Aktionspotentials verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu wird die anormale Gleichrichtung bei hyperpolarisierenden Stromimpulsen wirksam und verursacht ein spannungs- und zeitabhängiges Nachlassen des Spannungsabfalls über der Membran (s.Abb.13, Constantini & Galvan 1983, Kandel & Tauc 1966, Nelson & Frank 1967).
Im Voltage-Clamp tritt diese Gleichrichtung durch einen einwärts gerichteten, zeit- und spannungsabhängigen Strom in Erscheinung, der bei hyperpolarisierenden Spannungsimpulsen auftritt (s.Abb.16). Über die genauen Mechanismen dieses Stromes herrscht noch keine Übereinstimmung - höchstwahrscheinlich sind in verschiedenen Neuronen auch verschiedene Mechanismen für die anormale Gleichrichtung verantwortlich. Aus diesem Grund existieren auch unterschiedliche Bezeichnungen für den durch die Einwärtsgleichrichtung verursachten Strom. In Hippocampusneuronen wird er"I_Q" genannt (Adams & Halliwell 1982), bei den Stäbchen der Salamanderretina "I_h" (Bader et al. 1982) und bei den Zellen des Sinusknotens im Hasenherzen heißt er "I_F" (DiFrancesco & Ojeda 1980). Diese Ströme sind nichtselektive Kationenströme, während die anormale Gleichrichtung in Froschmuskelzellen durch einen selektiven Kalium-Einwärtsstrom hervorgerufen wird (Adrian 1969). Die anormale Gleichrichtung bei Molluskenneuronen kann eventuell sowohl durch Kationenströme als auch durch einen Chloridstrom bewirkt werden (Chesnoy-Marchais 1983).
Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann nicht entschieden werden, ob der vorliegende Strom der anormalen

Gleichrichtung einer dieser Gruppen zugeordnet werden kann. Die genaue Untersuchung der einzelnen langsamen Ströme kann erst dann erfolgen, wenn eine wirksame Trennung der einzelnen Anteile möglich ist, was bei Abschluß dieser Arbeit noch nicht der Fall war.
Die Ergebnisse mit den synaptischen Blockierern Curare und $CoCl_2$ beweisen jedoch, daß auch in L-Neuronen anormale Gleichrichtung vorliegt. Außerdem ist die Abgrenzung zu einem weiteren, durch Hyperpolarisation erregbaren Einwärtsstrom, dem sogenannten muscarinergen Strom ("M-current", "I_M") möglich (Halliwell & Adams 1982). Dieser Strom kehrt bei hyperpolarisierenden Spannungsimpulsen in der Nähe des Kaliumgleichgewichtspotentials seine Richtung um, während der Strom der anormalen Gleichrichtung ("I_{AR}") mit zunehmender Hyperpolarisation stärker wird und seine Richtung nicht umkehrt. Außerdem aktiviert I_M bei positiveren Potentialen (> -6o mV) als I_{AR}, der erst bei Spannungen < -7o mV in Erscheinung tritt. Beide Kennzeichen für I_{AR} treffen auch für die L-Neurone zu, so daß es sich nicht um den M-current handeln kann (Freschi 1983, Segal & Barker 1984).

Die anormale Gleichrichtung hat zwei wichtige Auswirkungen auf die Integration von Signalen. Erstens verursacht sie bei Hyperpolarisationen über ca. -7o mV hinaus eine gegenläufige Depolarisation, so daß das Membranpotential im Falle der L-Neurone wieder in Richtung Ruhepotential geschoben wird. Dies verursacht bei zunehmenden Hyperpolarisationen ein immer stärkeres phasisches Verhalten.

Ob zusätzlich zu diesem Kalziumstrom noch ein spannungs- und Kalziumabhängiger Kaliumstrom ("I_C", "$I_{K(Ca)}$") vorhanden ist, kann noch nicht entschieden werden. Ein Indiz dafür ergibt sich z.B. aus Abb.16a, in der bei sehr starken positiven Impulsen ein starker, langsamer Auswärtsstrom auftritt. Da die Voltage-Clamp Apparatur im allgemeinen keine sehr starken positiven Ströme zuließ, konnte diese Frage nicht näher untersucht werden, da der $I_{K(Ca)}$ vor allem bei positiven Potentialen nachgewiesen wird (Thomas 1984).

4.8 Die Lichtantwort der L-Neurone

Aus den Ergebnissen dieser und anderer Arbeiten lassen sich einige Folgerungen für die Verarbeitung von lichtinduzierten Potentialänderungen in L-Neuronen ableiten.
Simmons (1982b) zeigte, daß die Photorezeptoren im Libellenocellus inhibitorische, chemische Synapsen mit den L-Neuronen besitzen, und daß ihr Potential in Dunkelheit über der Schwelle der Transmitterfreisetzung liegt, so daß ständig etwas Transmitter ausgeschüttet wird. Aus der Blockade der synaptischen Übertragung durch Curare, sowohl am Libellenocellus (Klingman & Chappell 1978) als auch am Heuschreckenocellus (diese Arbeit), kann gefolgert werden, daß es sich um nikotinerge Acetylcholinsynapsen handelt.
Die ständige Transmitterfreisetzung von den Rezeptoren stellt dabei eine Mitursache für das starke "Rauschen" der L-Neurone beim Ruhepotential dar. Dies ergibt sich aus der Arbeit von Wilson (1978c), in der er mit $CoCl_2$ das "Rauschen" verringern

konnte. Dieses synaptische "Rauschen" wird durch das "Rauschen" des "window currents" verstärkt, wobei auch schwache regenerative Prozesse in Form von lokalen Antworten eine Rolle spielen dürften (Hengstenberg 1977). Bei positiven Stromimpulsen im Current-Clamp, bei denen die Kanäle des I_{Na} völlig inaktiviert sind, verbleibt immer noch ein Restrauschen, das synaptischen Ursprungs ist (s.Abb.13b). Dieses Restrauschen bleibt auch nach Behandlung mit Tetrodotoxin erhalten, durch die die Kanäle des "window currents" blockiert werden. Beide Befunde weisen darauf hin, daß zwei Mechanismen die starken Potentialschwankungen der L-Neurone beim Ruhepotential verursachen.

Bei Reizung mit einem Lichtblitz depolarisieren die Rezeptoren (Abb.8) und setzen damit verstärkt Acetylcholin frei, welches die L-Neurone hyperpolarisiert.

Aus der Bestimmung des Umkehrpotentials der Lichtantwort folgt, daß dabei synaptische Chlorid- und eventuell Kaliumkanäle geöffnet werden. Daß es sich nicht nur um Kaliumkanäle handeln kann, wird durch die Werte des Umkehrpotentials der Lichtantwort und des Kaliumgleichgewichtspotentials bewiesen. Das Umkehrpotential der Lichtantwort von -86 mV, das sehr gut mit Werten von Wilson (1978b, 4o mV negativ von Ruhepotential) und Simmons (1982a, 45 mV negativ von Ruhepotential) übereinstimmt, liegt nämlich negativ vom Kaliumgleichgewichtspotential (-75 mV, s.Abb.27). Somit müssen Chloridionen an der Generierung der Lichtantworten beteiligt sein. Über den genauen Wert des Chloridgleichgewichtspotentials läßt sich zwar nichts aussagen, er liegt aber in allen dahingehend

Zweitens beeinflußt die anormale Gleichrichtung die Effizienz von synaptischen Eingängen. Wird ein L-Neuron hyperpolarisiert, erhöht sich durch die anormale Gleichrichtung auch die nichtsynaptische Membranleitfähigkeit, und jede synaptische Leitfähigkeitsänderung wird weniger effektiv. Beim Ruhepotential dagegen ist die nichtsynaptische Leitfähigkeit geringer und synaptische Ströme rufen einen größeren Spannungsabfall über der Membran hervor (Kandel & Tauc 1966, Nelson & Frank 1967). Da die anormale Gleichrichtung bei L-Neuronen schon im physiologischen Bereich wirksam ist (s.Abb.13, Abb.16 und Abb.17), ist zu erwarten, daß derartige Effekte zumindest bei stärkeren Lichtreizen eine Rolle spielen.

4.7 Langsame Ströme in depolarisierender Richtung

Wie im Ergebnisteil schon erwähnt (s.3.3.4), gestaltet sich die Separierung der langsamen Ströme in L-Neuronen relativ schwierig, so daß noch keine eindeutigen Schlüsse gezogen werden können.
Die Ergebnisse der Versuche mit 4-Aminopyridin weisen jedoch darauf hin, daß auch in depolarisierender Richtung zumindest ein langsamer Strom vorhanden ist (s. 3.3.4.2).
Rogawski & Barker (1983) untersuchten den Effekt von 4-Aminopyridin auf Kalziumströme in Rückenmarksneuronen. Der Effekt, der sich in dieser Arbeit zeigt, gleicht qualitativ stark dem in der vorliegenden Arbeit (Abb.32). Die Autoren zeigen, daß dieser Effekt dabei nicht nur auf einer Blockade von

Kaliumkanälen durch 4-Aminopyridin, sondern auch auf der Erleichterung eines Kalziumeinstromes durch spannungsabhängige Kanäle beruht. Beide Wirkungen von 4-Aminopyridin dürften auch in der vorliegenden Untersuchung eine Rolle spielen. Ein spannungsabhängiger Kalziumstrom wird durch 4-Aminopyridin verstärkt und die Überlagerung mit I_A aufgehoben, so daß ein deutlicher Kalziumeinwärtsstrom sichtbar wird. Aus vielen Voltage-Clamp Versuchen in Normalringer läßt sich zusätzlich folgern, daß ein gewisser Kalziumstrom auch dort vorhanden ist, der sich durch einen Knick in der Stromregistrierung ca. 40 ms nach dem Einsetzen positiver Spannungsimpulse äußert (s.Abb.32b). Das Vorhandensein von Kalziumkanälen läßt sich auch aus EM-Aufnahmen folgern, aus denen hervorgeht, daß L-Neurone präsynaptisch zu anderen Neuronen sind (s.Abb.28 und L.J.Goodman et al. 1976). Da zur Transmitterfreisetzung im allgemeinen Kalziumkanäle notwendig sind, ist es sehr wahrscheinlich, daß solche Kanäle auch in L-Neuronen vorhanden sind.

Ob diese Kalziumleitfähigkeit im Normalzustand eine größere Rolle spielt, kann zum Teil durch die Current-Clamp Versuche beantwortet werden. Dort zeigen sich auf depolarisierende Stromimpulse vom Ruhepotential aus, und am Ende von hyperpolarisierenden Impulsen leichte Depolarisationen, die aufgrund des Zeitverlaufs durch diesen Kalziumstrom hervorgerufen werden könnten (s.Abb.13b). Der Effekt ist allerdings sehr gering, so daß keine stärkeren Auswirkungen im untersuchten Spannungsbereich zu erwarten sind.

untersuchten Nervenzellen negativ vom Kaliumgleichgewichts-potential (Hille 1977). Durch den Einstrom der Chlorid- und eventuell Kaliumionen werden die L-Neurone bis zur "on-Spitze" hyperpolarisiert, wobei sich die Schnelligkeit durch die Konvergenz von ca. 1ooo Rezeptoren auf sieben L-Neurone erklären läßt.
Dieser "on-Spitze" folgt bei mittleren und höheren Intensitäten des Lichtreizes eine Plateauphase, deren Entstehungsmechanismus umstritten ist. Klingman und Chappell (197), sowie Stone und Chappell (1981) vermuten einen direkten negativen Feedback von den L-Neuronen auf die Rezeptoraxone, so daß die Transmitterfreisetzung gehemmt wird. Strominjektionen in L-Neurone und gleichzeitiges Ableiten aus Rezeptoren (Simmons 1982b) sowie Widerstandsmessungen (Wilson 1978b) ergaben keine Bestätigung dieser Hypothese. Simmons (1982b) folgert, daß im Libellenocellus erregende Eingänge von anderen Sekundärneuronen und/oder Eigenschaften der prä- oder postsynaptischen Membran für die Entstehung der Plateauphase in L-Neuronen verantwortlich sind.
Aus der vorliegenden Arbeit muß geschlossen werden, daß für Heuschrecken nur der letztere Mechanismus in Frage kommt.

Der Klemmstrom der Lichtantwort in Abb.29 zeigt, daß das Absinken des Potentials von der "on-Spitze" zum Plateau zum großen Teil synaptischen Ursprungs ist, wobei ein direkter Einfluß des geklemmten Neurons, z.B. über Feedbacksynapsen auf Rezeptoraxone, ausgeschlossen ist. Eine Einwirkung anderer Sekundärneurone, die durch Lichtreizung erregt werden und

über andere Synapsen die L-Neurone depolarisieren, kann durch die Current-Clamp Versuche mit Lichtreizung ausgeschlossen werden. Da "on-Spitze" und Plateau beim gleichen Potential umkehren (s.Abb.11), müssen dieselben Ionen an der Entstehung beider Phasen beteiligt sein. Ein depolarisierender synaptischer Eingang müsste sein Umkehrpotential bei positiven Spannungen erreichen und sollte bei Hyperpolarisationen immer stärker werden. Da dies nicht der Fall ist, heißt das, daß die phasische Natur der Lichtantwort in den L-Neuronen von Locusta durch Eigenschaften der synaptischen Übertragung von den Rezeptoren auf die L-Neurone hervorgerufen wird. Außerdem muß aus der Untersuchung der anormalen Gleichrichtung gefolgert werden, daß bei stärkeren Lichtreizen, die das Membranpotential unter ca. -7o mV polarisieren, ein zusätzlicher depolarisierender Einfluß zustande kommt.

Aus Abb.11 wird weiterhin deutlich, daß die Schnelligkeit des Anstiegs von der "on-Spitze" zur Plateauphase darüber entscheidet, ob zusätzlich noch eine aktive Erregung einsetzt. In L-Neuronen der Biene treten zum Teil an diesem Übergang der beiden Phasen "Aktionspotentiale" auf (Milde 1984). In den L-Neuronen der Heuschrecke können dagegen bestenfalls lokale Antworten erregt werden, die allerdings dann die Schnelligkeit des Anstiegs verstärken und eventuell auch zu einem Einschwingverhalten führen können.
Warum bei Locusta an dieser Stelle der Lichtantwort keine "Aktionspotentiale" auftreten, kann zum Teil mit dem Phänomen des "Einschleichens" und zusätzlich mit der anormalen

Gleichrichtung erklärt werden. Bei einem starken Lichtreiz, der das Potential der "on-Spitze" unter die Schwelle des I_{Na} bringt und die Natriumkanäle zum großen Teil in den aktivierbaren Zustand versetzt, setzt auch bereits die anormale Gleichrichtung ein. Dadurch erhöht sich die Leitfähigkeit des Neurons, was die Entstehung eines "Aktionspotentials" erschwert. Außerdem wird infolge des relativ langsamen Übergangs von der "on-Spitze" zum Plateau die Schwelle des I_{Na} nach positiveren Werten verschoben ("Einschleichen"), so daß vor Impulsauslösung ein Großteil der Natriumkanäle wieder inaktiviert wird. Dadurch können höchstens noch kleine lokale Antworten erregt werden.

Das Spannungsniveau des Plateaus entscheidet schließlich darüber, ob und wie stark am Ende eines Lichtreizes "fast off transients" ausgelöst werden. Bei einem relativ negativen Plateau werden ein oder mehrere "fast off transients" erzeugt, da in diesem Bereich I_{Na} stark aktivierbar ist. Die "fast off transients" werden hier auch eine höhere Amplitude besitzen. Von einem relativ positiven Plateau aus kann dagegen bei Lichtende nur ein schwaches oder gar kein "fast off transient" hervorgerufen werden, da I_{Na} zum Großteil inaktiviert ist. Dies entspricht auch Messungen von Simmons (1982a), der die Abhängigkeit der Amplitudenhöhe von der vorausgehenden Hyperpolarisation untersuchte. Zusätzlich werden die Amplitude der "fast off transients" und die nachfolgende schnelle Hyperpolarisation von der Stärke des I_A beeinflußt.

Am schwierigsten gestaltet sich die Erklärung des "slow off transient". Wilson (1978b) schließt auf synaptische, depolarisierende Eingänge am Ende des Lichtreizes. Am Beispiel der Abb.11, wo auch der "slow off transient" bei negativen Strömen kleiner wird, kann dies allerdings nicht bestätigt werden. In anderen Fällen verstärkte sich aber der "slow off transient" bei hyperpolarisierenden Strömen (nicht dargestellt), so daß diese Möglichkeit bei vielen Zellen durchaus gegeben ist. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Erregung der spannungsabhängigen Kalziumleitfähigkeit, wobei deren Einfluß aber relativ gering sein dürfte (s. 4.7). Schließlich kann die synaptische Übertragung von den Rezeptoren auf die L-Neurone durch die vorausgehende Depolarisation der Rezeptoren verändert sein - eine Möglichkeit, die auch von Simmons (1982b) diskutiert wird.

Zur Klärung dieser Fragen sind weitere Untersuchungen zu den Übertragungseigenschaften der Synapsen zwischen Rezeptorzellen und L-Neuronen und zur Funktion der spikenden Zellen im Ocellus unumgänglich. Damit könnte eventuell auch das Zustandekommen der langen Nachpotentiale näher erklärt werden, die nach dem Ende starker Lichtreize auftreten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

An den L-Neuronen des medianen Ocellusnervs von Locusta migratoria L. wurden Current-Clamp und Voltage-Clamp Experimente durchgeführt, um die Membraneigenschaften dieser nichtspikenden Neurone zu untersuchen. Dabei ergaben sich folgende Befunde.

- Das Präparat des Ocellusnervs eignet sich gut für intrazelluläre Ableitungen mit zwei Elektroden und zur Untersuchung sowohl von Membraneigenschaften der L-Neurone, als auch von Verschaltungsfragen bei der Verarbeitung von Lichtreizen. Die aus der Literatur bekannten Lichtantworten von Rezeptorzellen und L-Neuronen wurden bestätigt.

- Die passiven Membraneigenschaften der L-Neurone entsprechen denen anderer Nervenzellen. Durch Lucifer Yellow Anfärbungen der L-Neurone und daraus ermittelte morphologischen Daten konnten die Membranparameter genau bestimmt werden. Der Eingangswiderstand R_N beträgt im Durchschnitt 1,6 MΩ, die Membranzeitkonstante τ ist 6.9 ms und die elektrotonische Länge L hat einen Wert von 1,35. Mit Hilfe der morphologischen Daten berechnen sich die passiven Membranparameter zu: Spez. Membranwiderstand $R_m = 2{,}7 \cdot 10^3\ \Omega \cdot cm^2$; spez. Innenwiderstand $R_i = 68\ \Omega \cdot cm$; spez. Membrankapazität $C_m = 2{,}6\ \mu F/cm$. Die Längskonstante λ beträgt 0,16 cm.

- Durch Current-Clamp Versuche wurde bewiesen, daß aktive Membranprozesse in L-Neuronen erregbar sind. Das Potential der Neurone, das im Ruhezustand bei ca. -4o mV liegt, muß dafür auf negativere Werte polarisiert werden. Die Schwelle der dann erregbaren "Aktionspotentiale" liegt bei -65 mV, ihre Amplitude beträgt nur etwa 3o mV. Sie erreichen nie positive Spannungswerte.

- Die an diesen "Aktionspotentialen" beteiligten Ionenströme wurden in Voltage-Clamp Versuchen charakterisiert. Es handelt sich dabei um einen schnellen Einwärtsstrom, der für den Aufstrich des "Aktionspotentials" verantwortlich ist, und um einen schnellen Auswärtsstrom, der die Amplitude begrenzt und die Repolarisation beschleunigt. Die geringe Amplitude der "Aktionspotentiale" wird höchstwahrscheinlich auch durch eine geringe Dichte der Kanäle des schnellen Einwärtsstromes bedingt.

- Der schnelle Einwärtsstrom kann durch Tetrodotoxin blockiert werden. Seine Aktivierungs- und Inaktivierungskennlinien entsprechen denen des I_{Na} "normaler", spikender Nervenzellen. Außergewöhnlich ist allerdings eine breite Überlappung der beiden Kennlinien, aufgrund der geschlossen wird, daß ein ständiger Natriumeinstrom in die L-Neurone zum Ruhepotential beiträgt. Dieser depolarisierende Einfluß kann durch Tetrodotoxin unterdrückt werden.

- Der schnelle Auswärtsstrom kann durch 4-Aminopyridin blockiert werden. Da außerdem seine Aktivierungs- und Inaktivierungskennlinien denjenigen des "transient potassium current" gleichen, wird er mit I_A bezeichnet.

- Neben diesen beiden schnellen Strömen existieren in den L-Neuronen noch ein "inward rectifying current" (I_{AR}), der durch Hyperpolarisationen unter -7o mV erregt wird, sowie ein schwacher, langsamer Einwärtsstrom, der durch Depolarisationen aktiviert wird. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um einen Kalziumeinstrom. Wegen eventueller Interferenzen mit synaptischen Leitfähigkeitsänderungen konnten die langsamen Ströme noch nicht genauer charakterisiert werden.

- Es wird gefolgert, daß I_{Na}, I_A und I_{AR} die Form der Lichtantwort eines L-Neurons beeinflußen. Insbesondere wird der "fast off transient" durch I_{Na} und I_A hevorgerufen. Der Strom der anormalen Gleichrichtung (I_{AR}) führt bei starken lichtinduzierten Potentialen zu einem verstärkt phasischen Verhalten der L-Neurone.

- Das Umkehrpotential der Lichtantwort der L-Neurone liegt bei ca. -85 mV. Aus dem Umkehrpotential des I_A folgt, daß das Kaliumgleichgewichtspotential bei etwa -75 mV liegt. Daraus wird geschlossen, daß die Lichtantwort durch eine synaptische Leitfähigkeitserhöhung für Chlorid- und eventuell Kaliumionen hervorgerufen wird. Die synaptische

Übertragung von den Rezeptoren läßt sich mit Curare blockieren, so daß auf eine cholinerge Übertragung geschlossen werden kann.

- Das Ruhepotential der L-Neurone läßt sich theoretisch mit einem erhöhten Kaliumgleichgewichtspotential und einem ständigen Natriumeinstrom ("window current") erklären. Indizien für beide Mechanismen ergeben sich aus dem Umkehrpotential des I_A und aus der Erniedrigung des Ruhepotentials auf ca. -5o mV unter Tetrodotoxineinfluß. Im erhöhten Ruhepotential liegt die Hauptursache für den nichtspikenden Charakter der L-Neurone.

- Durch das Klemmen der Lichtantwort im Voltage-Clamp Modus wird gezeigt, daß kein direkter Feedback des jeweils geklemmten L-Neurons auf die präsynaptischen Rezeptoren vorliegt. Die Form des synaptischen Stromes, sowie die Umkehrpotentiale der Lichtantworten im Current-Clamp lassen darauf schließen, daß entweder ein Feedback anderer Neurone auf die Rezeptoren oder Eigenschaften der synaptischen Übertragung die grobe Form der Lichtantworten bestimmen.

- Die Lichtantwort der L-Neurone verändert sich unter dem Einfluß sowohl von Tetrodotoxin, als auch von 4-Aminopyridin. Ein Teil dieser Änderungen kann durch veränderte spannungsabhängige Leitfähigkeiten erklärt werden. Ein starker Einfluß anderer Neurone auf die L-Neurone muß jedoch zusätzlich angenommen werden.

6. LITERATUR

Adams,D.J., Smith,S.J. & Thompson,S.H. 1980: Ionic currents in molluscan soma. Ann. Rev. Neurosci. 3: 141-167

Adams,P.R. 1982: Voltage-dependent conductances of vertebrate neurones. Trends NeuroSci. 5: 116-12o

Adams,P.R. & Halliwell,J.V. 1982: A hyperpolarization induced inward current in hippocampal pyramidal cells. J. Physiol. (London) 324: 62-63P

Adrian,R.H. 1969: Rectification in muscle membrane. Prog. Biophys. Molec. Biol. 19: 339-369

Bader,C.R., Bertrand,D. & Schwartz,E.A. 1982: Voltage-activated and calcium-activated currents studied in solitary rod inner segments from the salamander retina. J. Physiol. (London) 331: 253-284

Bezanilla,F., Vergara,J. & Taylor,R.E. 1982: Voltage clamping of excitable membranes. In: Biophysics. Methods of exp. Physics, Vol. 2o (ed. by G.Ehrenstein & H.Lecar). New York: Academic Press. pp. 445-511

Blight,A.R. & Llinás,R. 198o: The non-impulsive stretch-receptor complex of the crab: a study of depolarization-release coupling at a tonic sensimotor synapse. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 29o: 219-276

Brismar,T. 198o: Potential clamp analysis of membrane currents in rat myelinated nerve fibres. J. Physiol. (London) 298: 171-184

Chappell,R.L. & DeVoe,R.D. 1975: Action spectra and chromatic mechanisms of cells in the median ocelli of dragonflies. J. Gen. Physiol. 65: 399-419

Chappell,R.L. & Dowling,J.E. 1972: Neural organization of the median ocellus of the dragonfly. I. Intracellular electrical activity. J. Gen. Physiol. 6o: 121-147

Chappell,R.L., Goodman,L.J. & Kirkham,J.B. 1978: Lateral ocellar nerve projections in the dragonfly brain. Cell Tissue Res. 19o: 99-114

Chesnoy-Marchais,D. 1983: Characterization of a chloride conductance activated by hyperpolarization in APLYSIA neurones. J. Physiol. (London) 342: 277-3o8

Cole,K.S. 1949: Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. Arch. Sci. Physiol. 3: 253-258

Connor,J.A. & Stevens,C.F. 1971: Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. J. Physiol. (London) 213: 21-3o

Constantini,A. & Galvan,M. 1983: Fast inward-rectifying current accounts for anomalous rectification in olfactory cortex neurones. J. Physiol. (London) 385: 153-178

Crill,W.E. & Schwindt,P.C. 1983: Active currents in mammalian central neurons. Trends NeuroSci. 6: 236-24o

DiFrancesco,D. & Ojeda,C. 198o: Properties of the current i_f in the sino-atrial node of the rabbit compared with those of the current i_{K2} in Purkinje fibres. J. Physiol. (London) 3o8: 353-367

Edgington,D.R. & Stuart,A.E. 1979: Calcium channels in the high resistivity axonal membrane of photoreceptors of the giant barnacle. J. Physiol. (London) 294: 433-445

Fain,G.L. 1981: Integration by spikeless neurones in the retina. In: Neurones Without Impulses (ed. by A.Roberts & B.M.H.Bush). Cambridge: Cambridge University Press. pp. 29-59

Fein,H. 1966: Passing current through recording glass micro-pipette electrodes. IEEE Trans. Biomed. Engng. 13: 211-212

Frankenhaeuser,B. 196o: Quantitative description of sodium currents in myelinated nerve fibres of XENOPUS LAEVIS. J. Physiol. (London) 151: 491-5o1

Frankenhaeuser,B. 1962: Delayed currents in myelinated nerve fibres of XENOPUS LAEVIS investigated with voltage clamp technique. J. Physiol. (London) 16o: 4o-45

Frankenhaeuser,B. & Huxley,A.F. 1964: The action potential in the myelinated nerve fibres of XENOPUS LAEVIS as computed on the basis of voltage clamp data. J. Physiol. (London) 171: 3o2-313

Freschi,J.E. 1983: Membrane currents of cultured rat sympathetic neurons under voltage clamp. J. Neurophysiol. 5o: 146o-1478

Fukushima,Y. 1981: Single channel potassium currents of the anomalous rectifier. Nature 294: 368-371

Goodman,C.S. 1974: Anatomy of locust ocellar interneurons: constancy and variability. J. Comp. Physiol. 95: 185-2o1

Goodman,C.S. 1976a: Constancy and uniqueness in a large population of small interneurons. Science 193: 5o2-5o4

Goodman,C.S. 1976b: Anatomy of the ocellar interneurons of acridid grasshoppers. I. The large interneurons. Cell Tiss. Res. 175: 183-202

Goodman,C.S. & Williams,J.L.D. 1976: Anatomy of the ocellar interneurons of acridid grasshoppers. II. The small interneurons. Cell Tiss. Res. 175: 203-225

Goodman,L.J. 1970: The structure and function of the insect dorsal ocellus. Adv. Insect Physiol. 7: 97-195

Goodman,L.J. 1981: Organization and physiology of the insect dorsal ocellar system. In: Handbook of Sensory Physiology VII, 6 C, Vision in Invertebrates (ed. by H.Autrum) Berlin: Springer Verlag. pp. 201-286

Goodman,L.J., Patterson,J.A. & Mobbs,P.G. 1975: The projection of ocellar neurons within the brain of the locust, SCHISTOCERCA GREGARIA. Cell Tiss. Res. 157: 167-492

Goodman,L.J., Mobbs,P.G. & Guy,R.G. 1976: Information processing the course of a visual interneuron. Experientia 33: 748-750

Goodman,L.J., Mobbs,P.G. & Kirkham,J.B. 1979: The fine structure of the ocelli of SCHISTOCERCA GREGARIA: The neural organization of the synaptic plexus. Cell Tiss. Res. 196: 487-510

Gustafson,B., Galvan,M., Grafe,P. & Wigström,H. 1982: A transient outward current in a mammalian central neurone blocked by 4-Aminopyridine. Nature 299: 252-254

Guy,R.G., Goodman,L.J. & Mobbs,P.G. 1977: Ocellar connections with the ventral nerve cord in the locust SCHISTOCERCA GREGARIA: Electrical and anatomical characteristics. J. Comp. Physiol. 115: 337-350

Guy,R.G., Goodman,L.J. & Mobbs,P.G. 1979: Visual interneurons in the bee brain: Synaptic organization and transmission by graded potentials. J. Comp. Physiol. 134: 253-264

Hagiwara,S. 1973: Calcium spike. Adv. Biophys. 4: 71-102

Hagiwara,S. & Byerly,L. 1981: Calcium channels. Ann. Rev. Neurosci. 4: 69-125

Hagiwara,S., Miyazaki,S. & Rosenthal,N.P. 1976: Potassium current and the effekt of cesium on this current during anomalous rectification of the egg cell membrane of a starfish. J. Gen. Physiol. 67: 621-638

Halliwell,J.V. & Adams,P.R. 1982: Voltage clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. Brain Res. 25o: 71-92

Harris,J.E. & Martins-Ferreira,H. 1955: Membrane potentials in the muscles of the South American frog, LEPTODACTYLUS OCELLATUS. J. Exp. Biol. 32: 539-546

Hengstenberg,R. 1977: Spike responses of 'non-spiking' visual interneurone. Nature 27o: 338-34o

Hille,B. 1977: Ionic basis of resting potentials and action potentials. In: Handbook of Physiology, Sect. 1: The Nervous System, Vol. 1: Cellular Biology of Neurons, Part 1 (ed. by E.R.Kandel). Bethesda: Am. Physiol. Soc. pp. 99-136

Hodgkin,A.L. 1957: Ionic movements and electrical activity in giant nerve fibres. Proc. Roy. Soc. Lond. B 148: 1-37

Hodgkin,A.L. & Huxley,A.F. 1952: The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. J. Physiol. (London) 116: 473-496

Hodgkin,A.L., Huxley,A.F. & Katz,B. 1952: Measurements of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. J. Physiol. (London) 424-448

Hume,J.R. & Giles,W. 1983: Ionic currents in single isolated bullfrog atrial cells. J. Gen. Physiol. 81: 153-194

Järvilehto,M. & Zettler,F. 1971: Localized intracellular potentials from pre- and postsynaptic components in the external plexiform layer of an insect retina. Z. Vergl. Physiol. 75: 422-44o

Kandel,E.R. & Tauc,L. 1966: Anomalous rectification in the metacerebral giant cells and its consequences for synaptic transmission. J. Physiol. (London) 183: 287-3o4

Kaneko,A. 197o: Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina. J. Physiol. (London) 2o7: 623-633

Katz,B. 1949: Les constantes electriques de la membrane du muscle. Arch. Sci. Physiol. 3: 285-299

Katz,G.M. & Schwartz,T.L. 1974: Temporal control of voltage-clamped membranes: A examination of principles. J. Membrane Biol. 17: 275-291

Klingman,A. & Chappell,R.L. 1978: Feedback synaptic interaction in the dragonfly ocellar retina. J. Gen. Physiol. 71: 157-175

Koontz,M.A. & Edwards,J.S. 1984: Central projections of first-order ocellar interneurons in two orthopteroid insects ACHETA DOMESTICUS and PERIPLANETA AMERICANA. A comparative study. Cell Tiss. Res. 236: 133-146

Kostyuk,P.G. 198o:Calcium ionic channels in electrically excitable membrane. Neuroscience 5: 945-959

Kostyuk,P.G., Veselovsky,N.S. & Tsyndrenko,A.Y. 1981a: Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons - I. Sodium currents. Neuroscience 6: 2423-243o

Kostyuk,P.G., Veselovsky,N.S. & Fedulova,S.A. 1981b: Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons - II. Calcium currents. Neuroscience 6: 2431-2437

Kostyuk,P.G., Veselovsky,N.S., Fedulova,S.A. & Tsyndrenko,A.Y. 1981c:Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons - III. Potassium currents. Neuroscience 6: 2439-2444

Laughlin,S.B. 1973: Neural integration in the first optic neuropile of dragonflies. I. Signal amplification in dark adapted second-order neurons. J. Comp. Physiol. 84: 335-355

Lowe,D.A., Bush,B.M.H. & Ripley,S.H. 1978: Pharmakological evidence for 'fast' sodium channels in nonspiking neurones. Nature 274: 289-29o

Milde,J.J. 1981: Graded potentials and action potentials in the large ocellar interneurons of the bee. J. Comp. Physiol. 143: 427-438

Milde,J.J. 1984: Ocellar interneurons in the honeybee. Structure and signals of L-Neurons. J. Comp. Physiol. 154: 683-694

Milde,J.J. & Homberg,U. 1984: Ocellar interneurons in the honeybee. Characteristics of spiking L-Neurons. J. Comp. Physiol. 155: 151-16o

Mirolli,M. 1981: Fast inward and outward current channels in a non-spiking neurone. Nature 292: 251-253

Mirolli,M. 1984: Inward and outward currents in isolated dendrites of crustacea coxal receptors. Cell. Molec. Neurobiol. 3: 355-37o

Mizunami,M., Yamashita,S. & Tateda,H. 1982: Intracellular stainings of the large ocellar second order neurons in the cockroach. J. Comp. Physiol. 149: 215-219

Mobbs,P.G., Guy,R.G., Goodman,L.J. & Chappell,R.L. 1981: Relative spectral sensitivity and reverse Purkinje shift in identified L neurons of the ocellar retina. J. Comp. Physiol. 144: 91-97

Moore,J.W. & Cole,K.S. 1963: Voltage clamp techniques. In: Physical Techniques in Biological Research, Vol. VI. Electrophysiological Methods, Part B (ed. by W.L.Nastuk). New York: Academic Press. pp. 263-321

Naka,K.I. 1977: Functional organisation of catfish retina. J. Neurophysiol. 4o: 26-43

Nakajima,S., Iwasaki,S. & Obata,K. 1962: Delayed rectification and anomalous rectification in frog's skeletal muscle membrane. J. Gen. Physiol. 46: 97-115

Narahashi,T. 1974: Chemicals as tools in the study of excitable membranes. Physiol. Rev. 54: 813-889

Nelson,P.G. & Frank,K. 1967: Anomalous rectification in cat spinal motorneurons and effect of polarizing currents on excitatory postsynaptic potential. J. Neurophysiol. 3o: 1o97-1113

Park,M.R., Kita,H., Klee,M.R. & Oomura,Y. 1983: Bridge-balance in intracellular recording; introduction of the phase sensitive method. J. Neurosci. Methods 8: 1o5-125

Patterson,J.A. 1976: Neuronal architecture and function in the ocellar system of the locust. In: Neural principles in Vision (ed. by F.Zettler & R.Weiler). Berlin: Springer Verlag. pp. 334-353

Patterson,J.A. & Chappell,R.L. 198o: Intracellular responses of procion filled cells and whole nerv cobalt impregnation in the dragonfly median ocellus. J. Comp. Physiol. 139: 25-41

Patterson,J.A. & Goodman,L.J. 1974: Intracellular responses of receptor cells and second-order cells in the ocelli of the desert locust, SCHISTOCERCA GREGARIA. J. Comp. Physiol. 95: 237-25o

Pearson,K.G. 1976: Nerve cells without action potentials. In: Simpler Networks and Behaviour (ed. by J.G.Fentress). Sunderland, Mass.: Sinauer. pp. 99-110

Pearson,K.G. & Fourtner,C.R. 1975: Nonspiking interneuros in walking system of the cockroach. J. Neurophysiol. 38: 33-52

Pelhate,M. & Pichon,Y. 1974: Selective inhibition of potassium currents in the giant axon of the cockroach. J. Physiol. (London) 242: 90P

Pichon,Y. 1974: Axonal conduction in insects. In: Insect Neurobiology (ed. by J.E.Treherne). Amsterdam: North-Holland Publishing Comp. pp. 73-117

Pichon,Y. 1981: Pharmacological characterization of ionic channels in unmyelinated axons. J. Physiol. (Paris) 77: 1119-1127

Pichon,Y. & Boistel,J. 1967: Microelectrode study of the resting and action potentials of the cockroach giant axon with special reference to the role played by the nerve sheet. J. Exp. Biol. 47: 357-373

Rall,W. 1969: Time constants and electrotonic length of membrane cylinders and neurons. Biophys. J. 9: 1483-1508

Rall,W. 1977: Core conductor theory and cable properties of neurons. In: Handbook of Physiology, Sect. 1: The Nervous System, Vol. 1: Cellular Biology of Neurons, Part 1 (ed. by E.R.Kandel). Bethesda: Am. Physiol. Soc. pp. 39-98

Reichert,H., Plummer,M.R. & Wine,J.J. 1983: Identified nonspiking local interneurons mediate nonrecurrent, lateral inhibition of crayfish mechanosensory interneurons. J. Comp. Physiol. 151: 261-276

Richter,A. & Simon,E.J. 1975: Properties of centre-hyperpolarising red-sensitive bipolar cells in the turtle retina. J. Physiol. (London) 248: 317-334

Ripley,S.H., Bush,B.M.H. & Roberts,A. 1968: Crab muscle receptor which responds without impulses. Nature 218: 1170-1171

Roberts,A. & Bush,B.M.H. (eds.) 1981: Neurones without Impulses. Cambridge: Cambridge University Press

Rogawski,M.A. & Barker,J.L. 1983: Effects of 4-Aminopyridin on calcium action potentials and calcium current under voltage clamp in spinal neurons. Brain Res. 28o: 176-18o

Salkoff,L.B. & Wyman,R.J. 1983: Ion currents in drosophila flight muscles. J. Physiol. (London) 337: 687-7o9

Segal,M. & Barker,J.L. 1984: Rat hippocampal neurons in culture: Potassium conductances. J. Neurophysiol. 51: 14o9-1433

Segal,M., Rogawski,M.A. & Barker,J.L. 1984: A transient potassium conductance regulates the excitability of cultured hippocampal and spinal neurons. J. Neurosci. 4: 6o4-6o9

Shaw,S.R. 1968: Organization of the locust retina. Symp. Zool. Soc. Lond. 23: 135-163

Shepherd,G.M. 1983: Neurobiology. New York: Oxford University Press

Siegler,M.V.S. & Burrows,M. 1979: The morphology of local nonspiking interneurones in the metathoracic ganglion of the locust. J. Comp. Neurol. 183: 121-148

Sigworth,F.J. & Neher,E. 198o: Single Na channel currents obseved in cultured rat muscle cells. Nature 287: 447-449

Simmons,P.J. 1981: Synaptic transmission between second- and third-order neurones of a locust ocellus. J. Comp. Physiol. 145: 265-276

Simmons,P.J. 1982a: Transmission mediated with and without spikes at connexions between large second-order neurones of locust ocelli. J. Comp. Physiol. 147: 4o1-414

Simmons,P.J. 1982b: The operation of connexions between photoreceptors and large second-order neurones in dragonfly ocelli. J. Comp. Physiol. 149: 389-398

Smith,T.G.jr, Barker,J.L., Smith,B.M & Colburn,T.R. 198o: Voltage clamping with microelectrodes. J. Neurosci. Methods 3: 1o5-128

Stone,S.L. & Chappell,R.L. 1981: Synaptic feedback onto photoreceptors in the ocellar retina. Brain Res. 221: 374-381

Stuart,A.E. & Oertel,D. 1978: Neuronal properties underlying processing of visual information in the barnacle. Nature 275: 287-29o

Tachibana,M. 1983a: Ionic currents of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina. J. Physiol. (London) 345: 329-352

Tachibana,M. 1983b: Solitary horizontal cells in culture. I. Their electrical properties. Vis. Res. 23: 12o9-1216

Taylor,C.P. 1981: Graded interactions between identified neurons from the simple eyes of an insect. Brain Res. 215: 382-387

Thomas,M.V. 1984: Voltage-clamp analysis of a calcium-mediated potassium conductance in cockroach (PERIPLANETA AMERICANA) central neurones. J. Physiol. (London) 35o: 159-178

Thompson,S. 1982: Aminopyridine block of transient potassium current. J. Gen. Physiol. 8o: 1-18

Toh,Y. & Hara,S. 1984: Dorsal ocellar system of the American cockroach. II. Structure of the ocellar tract. J. Ultrastruct. Res. 86: 135-148

Toh,Y. & Sagara,H. 1984: Dorsal ocellar system of the American cockroach. I. Structure of the ocellus and ocellar nerve. J. Ultrastruct. Res. 86: 119-134

Treherne,J.E. 1972: A study of the function of the neural fat body sheat in the stick insect (CARAUSIUS MOROSUS). J. Exp. Biol. 56: 129-137

Treherne,J.E. 1974: The environment and function of insect nerve cells. In: Insect Neurobiology (ed. by J.E.Treherne) Amsterdam: North Holland Puplishing Comp. pp. 187-244

Treherne,J.E. & Schofield,P.K. 1981: Mechanisms of ionic homeostasis in the central nervous system of an insect. J. Exp. Biol. 95: 61-73

Werblin,F.S. 1975: Anomalous rectification in horizontal cells. J. Physiol. (London) 244: 639-657

Werblin,F.S. & Dowling,J.E. 1969: Organisation of the retina of the mudpuppy, NECTURUS MACULOSUS. II. Intracellular recording. J. Neurophysiol. 32: 339-355

Wilson,M. 1978a: The functional organisation of locust ocelli. J. Comp. Physiol. 124: 297-316

Wilson,M. 1978b: Generation of graded potential signals in the second order cells of locust ocellus. J. Comp. Physiol. 124: 317-331

Wilson,M. 1978c: The origin and properties of discrete hyperpolarising potentials in the second order cells of locust ocellus. J. Comp. Physiol. 128: 347-358

Wilson,W.A. & Goldner,M.M. 1975: Voltage clamping with a single microelectrode. J. Neurobiol. 6: 411-422

Zettler,F. & Järvilehto,M. 1971: Decrement-free conduction of graded potentials along the axon of a monopolar neuron. Z. Vergl. Physiol. 75: 4o2-421

Zettler,F. & Järvilehto,M. 1973: Active and passive axonal propagation of non-spike signals in the retina of Calliphora. J. Comp. Physiol. 85: 89-1o4

Zettler,F. & Weiler,R. 1981: Propagation of non-spike signals in retinal neurons. Vis. Res. 21: 1589-159o

Lebenslauf von Josef Ammermüller

Geboren am 27.9.51 in Rotthalmünster / Ndby. als Kind des Architekten Josef Ammermüller und seiner Frau Hildegard.

Herbst 1957: Eintritt in die Volksschule Safferstetten

Herbst 1962: Aufnahme in den naturwissenschaftlichen Zweig des Gymnasiums Pocking

Juni 1971: Abitur am Gymnasium Pocking

4.1o.71 - 31.1.73 : Ableistung des zivilen Ersatzdienstes im Bezirkskrankenhaus Haar

Sommer 1973: Beginn des Studiums der Physik an der Universität München

Herbst 1973: Hinzunahme des Faches Biologie mit Ziel Staatsexamen Biologie / Physik

Herbst 1978: Bestehen des Staatsexamens mit der Note gut. Zulassungsarbeit bei Prof. Zettler mit dem Thema: "Die Amakrinen Zellen der Karpfenretina"

15.2.79 - 3o.9.8o : Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle an der TU München. Beteiligung am Physiologischen Kurs und an den Bestimmungs - übungen des Zoolog. Inst. der Universität.

Anfang 198o: Beginn einer Doktorarbeit bei Prof. Zettler. Thema: "Membraneigenschaften nichtspikender Neurone".

1.4.81 - 31.12.81 : Verwalter einer halben Assistentenstelle am Zoologischen Institut der Universität München

1.1.82- 3o.6.84 : Stelle und Förderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft